



**LOCALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DURANTE  
O DESENVOLVIMENTO DE OVÁRIOS DE PLANTAS DE  
*Brachiaria brizantha* SEXUAL E APOMÍTICA**

**Elizangela Ribeiro Alves**

**Orientação: Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro**

**Universidade de Brasília  
Instituto de ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular**

Brasília, 2007

*Aos meus queridos pais pela dedicação, companheirismo e carinho. Ao meu amor, Edimilson, pelo companheirismo, atenção e principalmente compreensão nos momentos difíceis. Aos meus amados filhos Gustavo, Laura e Renato pela alegria, criatividade e principalmente pela capacidade de me tornar uma pessoa melhor... As minhas orientadoras Dra. Vera e Dra. Diva pelo incentivo e colaboração!*

*Ofereço com muito amor!!!*

## Agradecimentos especiais

*A minha orientadora Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro pela confiança e incentivo desde os meus primeiros passos nessa fascinante busca que nos renova e enriquece a cada dia - A P E S Q U I S A. Além da amizade, incentivo, afeto e compreensão nos momentos difíceis que enfrentei durante essa longa jornada. Muito obrigada!*

*A co-orientadora Dra. Diva Maria de Alencar Dusi - uma pessoa iluminada - pela amizade, apoio, incentivo, segurança e serenidade em todos os momentos. Aprendi muito com você mestre! Serei eternamente grata.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, disposição, força e sabedoria para ser mãe, esposa, amiga e aluna de doutorado sem ter crise depressiva.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por propiciar as condições de realização desse trabalho.

Ao departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília pela oportunidade de cursar esta pós-graduação.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Às amigas, do laboratório de microscopia, Ana Cristina Gomes e Rosana Falcão pelo auxílio no processamento das amostras e principalmente pela amizade e carinho. Ana você sabe o quanto eu a estimo, muito obrigada por tudo!

Às minhas queridas amigas do laboratório de Apomixia: Ana Luiza, Érica e Larissa pelo auxílio no trabalho, pela amizade e pelo companheirismo. Sou muitíssimo grata!

À Glaucia Cabral pelo auxílio, força e incentivo.

Ao Dr. Michiel T. M. Willemse pelo auxílio nos experimentos de polinização in vitro.

À Dra. Cacilda B. do Valle por ceder material vegetal para experimentos preliminares de polinização in vitro.

Ao pessoal da plataforma de seqüenciamento do CENARGEN

À Dra. Ana Ciampi e a Vânia pela disposição em ajudar disponibilizando o seqüenciador em caráter de urgência das últimas amostras.

Ao Dr. Alan Carvalho por disponibilizar o phosphoimager

À Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo pelas primeiras lições sobre interpretação morfológica de sacos embrionários, que me foram muito úteis para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Felipe Silva e a Dra. Luciane Melo da Bioinformática pela ajuda com a análise de seqüências.

Ao Bruno, Sydney e Keila pelos ovários, que não foram poucos!

A Profa. Dra. Sônia Bao pelo empréstimo do *Knifemaker* para confecção das navalhas e do freezer para polimerização das amostras.

Ao Profs. Drs. Edvaldo X. F. Filho e Bergmann M. Ribeiro pelo apoio e atenção.

À Eliana Santana pelas primeiras noções de microtomia.

Aos Drs. Francisco Aragão e Ildinete Silva Pereira pelas sugestões no ato da qualificação.

Aos Drs. Diva Maria de Alencar Dusi, Francisco Aragão, Ildinete Silva Pereira, Márcio Alves Ferreira e Mauro Carneiro por aceitarem participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Dr. Roberto Togawa pelo auxílio na formatação desta.

À Dra. Aline Pic e Simone Ribeiro pelo auxílio com o *northern blot*

Ao Dr. Osmundo Brilhante pelas primeiras noções de 5'RACE

À Andréa D. Koehler pela ajuda na revisão final.

Aos meus grandes amigos, quase irmãos, Vanilza e Giovanni pela amizade e companheirismo.

A Elsa, Giovanni, Francisco e a todos do laboratório de transformação genética pelos empréstimos e pela boa vontade em servir. Muito obrigada!

Ao Dr. Mauro Carneiro e Leila Barros pelo empréstimo do espectrofotômetro. Leila muito obrigada por me confortar nos momentos nos quais eu me sentia angustiada.

Às minhas amigas Alê, Loeny, Karina e Daniele pelos empréstimos, carinho e apoio.

Aos colegas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disposição em ajudar sempre que necessário.

À Ana do departamento de Biologia Celular pelo carinho e atenção.

Aos meus pais pelo apoio, amor e dedicação a mim e aos meus filhos. Mãe sem a sua ajuda teria muito mais difícil.

Ao meu querido esposo Edimilson pelo carinho, incentivo, paciência e principalmente por compreender a minha ausência e cansaço constante.

Aos meus amados filhos Gustavo, Laura e Renato pelo sorriso, os beijos, os abraços apertados que me revigoravam e me faziam persistir mesmo nos momentos mais difíceis. Eu os amo muito meus filhos!!!

Aos meus irmãos Ozires e Weder por estarem ao lado dos meus pais nos momentos que para mim não foram possíveis e também por me amarem e se orgulharem de me ter como irmã.

À tia Ana por ter cuidado de mim nesses últimos dias, obrigada!

Enfim, a todas as pessoas que de uma forma ou outra colaboraram para a concretização desse trabalho!

## ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ANA	ácido naftlenoacético
APO	apomítico
AO	Laranja de acridina
BAP	6-benzilaminopurina
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt</i>
BMM	butil-metil-metacrilato
BSA	Albumina de soro bovino
DAPI	<i>4'-6'-diamidino-2-phenylindole</i>
DEPC	di-etil-pirocarbonato
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
GA3	ácido giberélico
IPTG	isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
LB	(luria-bertani)
MOPS	<i>(3- [N-morpholino] propanesulfonic acid)</i>
MPC	concentrador magnético de partículas
NBT	<i>nitro-blue tetrazolium chloride</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEX	sexual
SSPE	Tampão salino de sódio-fosfato-edta
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tris-HCl	Tampão Tris-borato-EDTA
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-glucoronídeo

# Índice geral

<b>AGRADECIMENTOS ESPECIAIS</b> .....	<b>III</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. BRACHIARIA</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Classificação taxonômica.....	3
1.1.2. Importância agronômica.....	3
<b>1.2. REPRODUÇÃO EM ANGIOSPERMAS</b> .....	<b>4</b>
1.2.1. Anfimixia.....	5
1.2.2. Apomixia.....	6
1.2.2.1. Histórico.....	8
1.2.2.2. Importância da apomixia na agricultura.....	9
1.2.2.3. Apomixia facultativa.....	10
1.2.2.4. Apomixia e pseudogamia.....	11
1.2.2.5. Apomixia e poliploidia.....	12
1.2.2.6. Bases genéticas da apomixia.....	14
1.2.2.7. Caracterização da apomixia: enfoque experimental.....	16
1.2.2.8. Estratégias de estudo da apomixia.....	17
<b>1.3. ESTADO DA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DA APOMIXIA EM <i>BRACHIARIA</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.4. FERTILIZAÇÃO IN VITRO</b> .....	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	28
3.2. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU.....	29
3.2.1. Preparo das lâminas.....	29
3.2.2. Preparo do tecido.....	29
3.2.3. Teste com laranja de acridina.....	30
3.2.4. Síntese das sondas marcadas com digoxigenina.....	30
3.2.5. <i>Dot blot</i> .....	33

3.2.6. Reação de hibridização .....	33
3.2.7. Reação de pós-hibridização e detecção imunológica .....	34
<b>3.3. EXTRAÇÃO DE RNA .....</b>	<b>35</b>
3.3.1. Coleta de ovários para extração de RNA .....	35
3.3.2. Extração de RNA total .....	35
3.3.3. Purificação de RNA poli-A <sup>+</sup> de ovários de <i>Brachiaria brizantha</i> .....	36
<b>3.4. EXTENSÃO TERMINAL 5' DE CDNA POR 5'RACE - RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS.....</b>	<b>36</b>
.....36	
3.4.1. Síntese da primeira fita de cDNA .....	37
3.4.2. Síntese da segunda fita de cDNA - 5'RACE .....	37
3.4.3. Purificação da segunda fita de cDNA .....	37
3.4.4. Ligação do adaptador 5' RACE ao cDNA fita dupla (ds cDNA) .....	38
3.4.5. Desenho dos iniciadores específicos para o experimento de 5' RACE .....	39
3.4.6. Reação de 5' RACE .....	40
3.4.7. Purificação dos produtos da reação de 5' RACE .....	40
3.4.8. Preparo de <i>E. coli</i> eletrocompetentes .....	40
3.4.9. Clonagem e transformação dos produtos da reação de 5' RACE .....	41
<b>3.5. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (LISE ALCALINA) EM PEQUENA ESCALA.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6. ANÁLISE DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS PRODUTOS DA EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL .....</b>	<b>45</b>
<b>3.7. SEQÜENCIAMENTO DE DNA .....</b>	<b>45</b>
<b>3.8. ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>3.9. NORTHERN BLOT .....</b>	<b>46</b>
<b>3.10. POLINIZAÇÃO IN VITRO .....</b>	<b>47</b>
3.10.1. Determinação da viabilidade polínica .....	47
3.10.2. Meio de cultura para germinação e crescimento de polens .....	48
3.10.3. Maturidade da antera .....	48
3.10.4. Desinfestação das inflorescências .....	49
3.10.5. Escolha do explante receptor do pólen .....	49
3.10.6. Estabelecimento de meio para manutenção de ovários polinizados .....	50
3.10.7. Polinização in vitro .....	50
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. DESCRIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO ÓVULO DE <i>B. BRIZANTHA</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL DE SECÇÕES DE OVÁRIOS A SEREM SUBMETIDOS À HIBRIDIZAÇÃO IN SITU .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3. LOCALIZAÇÃO DOS TRANSCRITOS DOS CLONES 07, 10 E 29. ....</b>	<b>58</b>
<b>4.4. LOCALIZAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE <i>BBRIZMYO</i>, <i>BBRIZAQP</i> E <i>BBRIZMAPK</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>4.5. LOCALIZAÇÃO DO TRANSCRITO DE <i>BBRIZREC</i> (CLONE 20) EM <i>B. BRIZANTHA</i> E <i>B. DECUMBENS</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>4.6. VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DOS RNAs E CDNAS .....</b>	<b>76</b>
<b>4.7. AMPLIFICAÇÃO DE <i>BBRIZREC</i> POR 5' RACE .....</b>	<b>76</b>
<b>4.8. DETECÇÃO DO TRANSCRITO <i>BBRIZREC</i> POR <i>NORTHERN BLOT</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>4.9. POLINIZAÇÃO IN VITRO .....</b>	<b>81</b>
4.9.1. Viabilidade do pólen.....	81

4.9.2. Meio de cultura .....	85
4.9.3. Maturidade de anteras .....	86
4.9.4. Polinização in vitro .....	86
4.9.5. Meio para manutenção do explante após a polinização in vitro.....	97
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>98</b>
5.1. LOCALIZAÇÃO DOS TRANSCRITOS AOS CLONES 07, 10 E 29. ....	98
5.2. LOCALIZAÇÃO DOS TRANSCRITOS DE <i>BBRIZMYO</i> , <i>BBRIZMAPK</i> E <i>BBRIZAQP</i> .....	100
5.3. LOCALIZAÇÃO DO TRANSCRITO DE <i>BBRIZREC</i> (CLONE 20) EM <i>B. BRIZANTHA</i> E <i>B. DECUMBENS</i> ...	108
5.4. EXPRESSÃO DE GENES SUPOSTAMENTE RELACIONADOS À APOMIXIA .....	113
5.5. POLINIZAÇÃO IN VITRO .....	114
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>120</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>122</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>124</b>
<b>LEGENDAS DAS FIGURAS 09; 11; 13; 15; 16; 17; 18; 22; 27 e 28.</b>	
.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura floral de <i>Brachiaria</i> sp.....	2
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das diferenças entre os modos de reprodução sexual e apomítico.....	7
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da morfologia dos óvulos de <i>B. brizantha</i> sexual e apomítica durante o desenvolvimento da semente.....	20
<b>Figura 4:</b> Especificidade da hibridização por <i>northern</i> reverso dos cDNAs isolados por DD-PCR (Rodrigues et al 2003) utilizados no presente trabalho.....	25
<b>Figura 5:</b> Mapa do vetor de clonagem dos produtos do DDPCR, pGEM®-T Easy.....	32
<b>Figura 6:</b> Mapa do vetor de clonagem dos produtos de 5' RACE PCR e PCR, pCR 2.1®.....	43
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do desenvolvimento do óvulo em <i>Brachiaria</i> .....	55
<b>Figura 8:</b> Secções histológicas de ovários de <i>B. brizantha</i> , acesso apomítico, coradas com laranja de acridina.....	57
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática da expressão dos clones 07, 10 e 29 durante o desenvolvimento do óvulo de <i>B. brizantha</i> sexual e apomítica.....	59
<b>Figura 10:</b> Expressão do clone 07 durante o desenvolvimento de ovários de <i>B. brizantha</i> sexual.....	61

<b>Figura 11:</b> Ovários de <i>B. brizantha</i> apomítica hibridizados com a sonda 07.....	62
<b>Figura 12:</b> Secções semi-finas de vários de plantas apomítica e sexual de <i>B. brizantha</i> hibridizadas com a sonda clone 10 senso e anti-senso.....	64
<b>Figura 13:</b> Expressão do clone 29 em ovários de planta apomítica e sexual de <i>B. brizantha</i> .....	66
<b>Figura 14:</b> Representação esquemática da expressão de <i>BbrizMYO</i> , <i>BbrizAQP</i> e <i>BbrizMAPK</i> durante o desenvolvimento de óvulos de plantas apomíticas. A coloração mais intensa indica o local de maior expressão.....	67
<b>Figura 15:</b> Localização da expressão de <i>BbrizMYO</i> por hibridização in situ em secções semi-finas de óvulos de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual.....	69
<b>Figura 16:</b> Localização da expressão de <i>BbrizAQP</i> e <i>BbrizMAPK</i> por hibridização in situ em secções semi-finas de óvulos de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual.....	71
<b>Figura 17:</b> Representação esquemática da expressão de <i>BbrizREC</i> durante o desenvolvimento de óvulos de plantas sexuais (SEX) e apomíticas (APO) de <i>Brachiaria</i> .....	72
<b>Figura 18:</b> Localização da expressão do transcrito <i>BbrizREC</i> por hibridização em secções semi-finas de óvulos de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual e de <i>B. decumbens</i> apomítica e sexual.....	75
<b>Figura 19:</b> Análise de RNA total e cDNA de ovários, em	

megasporogênese, <i>B. brizantha</i> .....	76
<b>Figura 20:</b> Esquema da seqüência nucleotídica de <i>BbrizREC</i> . <b>A-</b> seqüência primária de <i>BbrizREC</i> gerada por 5' RACE.....	78
<b>Figura 21:</b> Análise da expressão do clone 20 em diferentes tecidos de plantas sexuais e apomíticas de <i>B. brizantha</i> por <i>northern blot</i> .....	80
<b>Figura 22:</b> Germinação de polens e crescimento de tubos polínicos de <i>B. decumbens</i> .....	84
<b>Figura 23:</b> Comparação das porcentagens de polens viáveis em anteras de flores antes e durante a antese.....	86
<b>Figura 24:</b> Comparação das porcentagens de tubos polínicos aderidos à base de ovários 24 horas após a polinização in vitro de diferentes acessos de <i>Brachiaria</i> .....	87
<b>Figura 25:</b> Penetração de tubos polínicos, 1 dia após polinização in vitro, na base seccionada de ovários de <i>Brachiaria</i> .....	88
<b>Figura 26:</b> Penetração e descarga de tubos polínicos em ovários de <i>Brachiaria</i> in vitro 1 dia após polinização (DAP) e (2DAP).....	90
<b>Figura 27:</b> Diferentes secções, do mesmo ovário de <i>B. decumbens</i> apomítica polinizado in vitro, mantido em cultura e incluído 2 dias após polinização, coradas com azul astra e safranina e analisadas em microscópio de luz.....	92
<b>Figura 28:</b> Secções de ovário de <i>B. humidicola</i> apomítica polinizado in	

vitro, mantido em cultura e incluído 2 dias após polinização, coradas com azul astra e safranina e visualizadas em microscópio de luz..... 94

**Figura 29:** Ovários polinizados in vitro, mantidos em cultura e incluídos 2 dias após polinização corados com azul astra e safranina e observados em microscopia de luz..... 96

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Especificidade da hibridização por <i>northern</i> reverso dos cDNAs isolados por DD-PCR megasporogênese ou megagametogênese.....	24
<b>Tabela 2:</b> Origem do material vegetal utilizado nos experimentos deste trabalho.....	28
<b>Tabela 3:</b> Características principais dos iniciadores utilizados para o 5'RACE PCR.....	39
<b>Tabela 4:</b> Similaridade da seqüência deduzida de aminoácido de <i>BbrizREC</i> (1037 nucleotídeos) contra diferentes seqüências de proteínas do banco de dados não redundante pelo NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ Blast.cgi</a> ).....	79
<b>Tabela 5:</b> Classificação quanto ao desenvolvimento e viabilidade de polens presentes em anteras maduras de diferentes espécies de <i>Brachiaria</i> .....	82
<b>Tabela 6:</b> Faixa de concentração de sacarose no meio de cultura e melhor média de germinação de pólen obtida em diferentes acessos de <i>Brachiaria</i> .....	85

## Resumo

*Brachiaria* é uma gramínea de grande importância econômica. No Brasil, são estimados 70 milhões de hectares cultivados com esta forrageira. Seu melhoramento e a ampliação da variabilidade genética são de grande importância para a sustentabilidade e crescimento da agropecuária no Brasil. Um dos entraves para o melhoramento *Brachiaria* é a presença da apomixia, modo de reprodução onde não há recombinação para a formação do embrião. A compreensão dos mecanismos que regulam a apomixia possibilitará a utilização desse modo de reprodução como ferramenta biotecnológica para fixar características agronômicas de interesse em espécies cultivadas. A ocorrência de apomixia em espécies, como as de *Brachiaria*, que conservaram a habilidade de se reproduzir por sexualidade permite estudos comparativos, tanto estruturais, quanto genéticos e moleculares. Comparações, ao longo do desenvolvimento, entre sacos embrionários de plantas sexuais e apomíticas poderão revelar as diferenças que irão especificar se um saco embrionário seguirá a via apomítica ou sexual. Neste trabalho foi comparada, por hibridização *in situ*, a expressão temporal e espacial de sete seqüências de cDNA em ovários de plantas sexuais e apomíticas de *Brachiaria*. Nas plantas apomíticas, o transcrito de *BbrizREC* foi detectado preferencialmente no meiócito, no momento imediatamente anterior à diferenciação de iniciais apospóricas, indicando que esse transcrito pode estar associado à morte programada do meiócito e ao aparecimento das iniciais apospóricas. Em momentos posteriores da diferenciação, precursores da fertilização, *BbrizMYO*, *BbrizAQP*, *BbrizMAPK* apresentaram expressão preferencial nas sinérgides, sugerindo o envolvimento de *BbrizMYO* e *BbrizMAPK* no processo de fertilização e de *BbrizAQP* na ativação da oosfera. Nas apomíticas peseudogâmicas o embrião é formado a partir do desenvolvimento autônomo da oosfera, mas a fertilização da célula central é necessária para formar o endosperma. O presente trabalho também contribuiu para o estabelecimento da técnica de fertilização *in vitro* em *Brachiaria* que permitirá, em condições controladas, avaliar o papel de diferentes genes no decorrer deste processo e assim contribuir à melhor compreensão da reprodução em angiospermas.

## Abstract

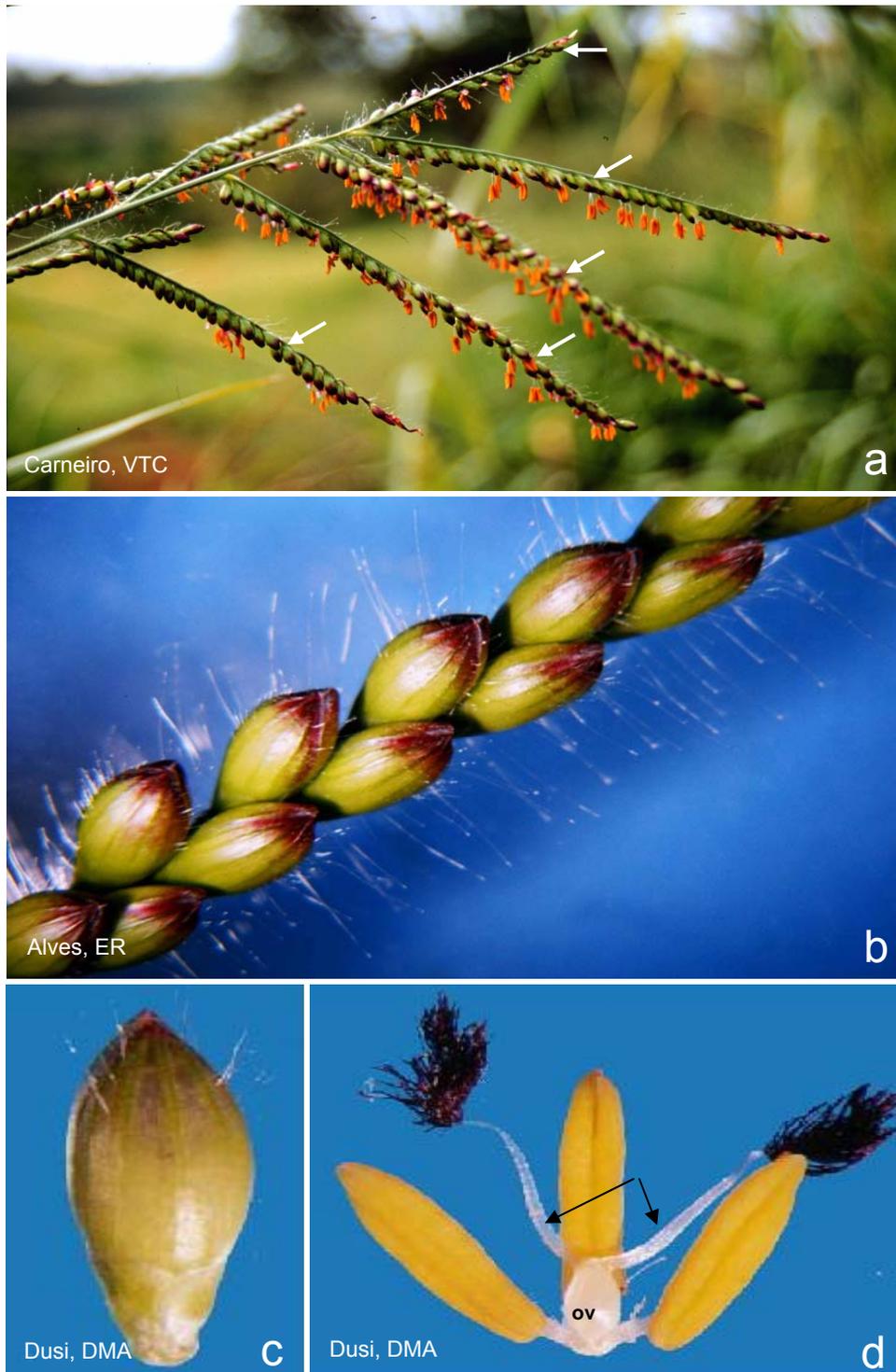
*Brachiaria* is a forage grass of great economic importance. In Brazil, an estimated area of 70 million hectares is cultivated with *Brachiaria* species. Improvement of breeding programs and genetic variability is very important for the culture and sustainability of pastures in Brazil. One of the barriers for *Brachiaria* improvement is the asexual mode of reproduction through seeds - apomixis. The understanding of the mechanisms that regulate apomixis makes possible its use in biotechnological programs to fix interesting agronomic characteristics in cultivated plants. Species that show both apomictic and sexual mode of reproduction allow morphological, genetic and molecular comparative studies. Analysis of embryo sac development from sexual and apomictic plants can report the differences that will specify the sexual or apomictic pathway. In the present work, the temporal and spatial expression of cDNA sequences was analyzed by in situ hybridization in ovaries of apomictic and sexual plants. *BbrizREC* was preferentially expressed in the meiocyte, just before apospore initials differentiation, suggesting its involvement in programmed cell death of the meiocyte and appearance of apospore initials. Later on in the reproduction, before fertilization, *BbrizMYO*, *BbrizAQP*, *BbrizMAPK* were preferentially expressed in the synergids, suggesting that *BbrizMYO* and *BbrizMAPK* are concerned in this process and *BbrizAQP* in egg cell activation. In pseudogamic apomicts embryo is formed from autonomous development of the egg cell, but the central cell fertilization is required to form the endosperm. The present work contributed to establishing an in vitro fertilization technique in *Brachiaria* that will make possible, in controlled conditions, to evaluate the role of different genes along this process, contributing to a better understanding of reproduction in angiosperms.

# 1. Introdução

## 1.1. *Brachiaria*

Reconhecido em 1953, por Grisebach, o gênero *Brachiaria* compreende aproximadamente 100 espécies (Renvoize et al., 1996) que são amplamente distribuídas nos trópicos, e principalmente na África que é o centro de origem desse gênero (Nunes, 1984).

*Brachiaria* apresenta colmo herbáceo que floresce uma vez por ano. No Brasil o período de floração se inicia nos últimos dias de dezembro e se estende até meados de julho. As inflorescências são terminais do tipo panícula, compostas por racemos. Cada racemo, por sua vez, sustenta uma série de espiguetas solitárias e unisseriadas (Nunes, 1984). A espiguetas é composta por duas flores. A flor hermafrodita abriga três anteras e um pistilo com apenas um ovário uniovular. A flor estaminada se difere da hermafrodita exclusivamente pela ausência de pistilo (Seiffert, 1980) (Figura 1).



**Figura 1:** Estrutura floral de *Brachiaria* sp. **a-** inflorescência terminal composta de racemos (seta). **b-** detalhe do racemo que é composto por espiguetas unisseriadas, dispostas ao longo de um único lado da raque. **c-** visão em detalhe da porção abaxial da espiguetas. **d-** flor hermafrodita com três anteras (amarelas) e um pistilo constituído de um ovário (OV) e estigma bifido (seta), e ramificado na extremidade.

### 1.1.1. Classificação taxonômica

Divisão:.....	Anthophyta
Subdivisão:.....	Angiospermae
Classe:.....	Monocotyledonae
Ordem:.....	Pales (Glumiflorales)
Família:.....	Poaceae (Gramineae)
Subfamília:.....	Panicoideae
Tribo:.....	Panicea
Gênero:.....	<i>Brachiaria</i>

### 1.1.2. Importância agronômica

A produção animal e a indústria da carne, leite e derivados representam importante setor da economia brasileira, uma vez que têm posição de destaque na constituição do produto interno bruto. O Brasil abriga o maior rebanho bovino comercial do mundo. Atualmente, são abatidas de 32 a 34 milhões de cabeças, por ano; movimentando em torno de R\$ 12 bilhões, se somados o ganho com cortes de carne, couro, e outros subprodutos (Polaquini et al., 2006). Contudo, o setor pode se tornar mais competitivo e gerar divisas ainda mais significativas para o país. Nesse sentido, é indispensável buscar novas tecnologias que possam resultar num aumento de produtividade.

No Brasil, onde a criação do rebanho bovino se dá principalmente a campo, sob o regime de pastagem, a melhoria da qualidade das forrageiras está diretamente relacionada ao aumento da produtividade do rebanho.

Entre as forrageiras, as do gênero *Brachiaria* conquistaram importância econômica significativa no Brasil e no mundo. Essa posição de destaque no cenário econômico se deve a várias de suas espécies apresentarem características agronômicas desejáveis para as forrageiras que facilita sua

adaptação a vários tipos de solos (Fisher & Kerridge, 1996). No Brasil, em 1996, Fisher e Kerridge estimaram aproximadamente 70 milhões de hectares cultivados com esta forrageira. A comercialização de espécies de *Brachiaria* é feita por meio de sementes. A germinação da semente e o crescimento da parte aérea são rápidos, resultando num rápido forrageio do solo (Fisher & Kerridge, 1996). A maior parte das pastagens tropicais no Brasil foi formada com espécies do gênero *Brachiaria* principalmente *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. humidicola* ([www.abrasem.com.br/materia\\_tecnica/2004/0008\\_parceria\\_embrapa\\_unipastos.htm](http://www.abrasem.com.br/materia_tecnica/2004/0008_parceria_embrapa_unipastos.htm)). De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), no Brasil, aproximadamente 5,5 milhões de ha de pastagens permanente são replantadas anualmente. Por ano, são necessários 80.000 t de sementes e dessas 50% são de *B. brizantha* ([www.fao.org](http://www.fao.org), consulta em novembro de 2006).

O melhoramento genético de *Brachiaria* visando o aumento do teor protéico, redução de lignina, resistência a pragas e doenças e a ampliação da variabilidade genética são de grande importância para a sustentação e crescimento da agropecuária no Brasil (Valle et al., 2004).

## **1.2. Reprodução em angiospermas**

As angiospermas surgiram há pelo menos 130 milhões de anos (Raven et al., 1992) e conquistaram vantagens evolutivas que as tornaram a vegetação dominante na Terra. Este grupo de plantas agrega características vegetativas muito variadas e uma característica peculiar: as sementes são formadas dentro de um ovário desenvolvido - fruto. O modo de reprodução, anfimítico (sexual)

ou apomítico (assexual), ou ainda a presença de ambos, caracteriza o potencial reprodutivo da maioria das angiospermas que se subdividem em duas classes, Dicotyledonae e Monocotyledonae com aproximadamente 65.000 e 170.000 espécies respectivamente (Raven et al., 1992; Raghavan, 1997).

### **1.2.1. Anfimixia**

Na maioria das angiospermas, a forma de reprodução sexual, anfimixia, é predominante. A característica mais importante dessa forma de reprodução é a capacidade de gerar descendentes diferentes dos pais, proporcionando assim, a variabilidade genética. Este processo envolve a recombinação cromossômica que ocorre durante a formação dos gametas reduzidos; e a combinação de material genético materno e paterno mediada pela dupla fertilização, que resulta na produção de embriões geneticamente diferente dos progenitores. O gametófito feminino ou saco embrionário resulta de meiose que ocorre dentro do ovário, no óvulo, por meio de processos consecutivos denominados megasporogênese e megagametogênese. Na megasporogênese, uma célula do nucelo se diferencia em célula-mãe do megásporo que por meio de meiose forma uma tétrade de megásporos haplóides, dos quais três degeneram. Na megagametogênese, o megásporo sobrevivente ou funcional se diferencia, e após três mitoses consecutivas e diferenciação celular, origina um saco embrionário do tipo Polygonum, que segundo van Went e Willemse (1984) é o mais comum entre as angiospermas. O saco embrionário do tipo Polygonum é composto de sete células: três antípodas, duas sinérgides, uma célula central e uma oosfera. Na maturidade, por meio de um processo conhecido por dupla fertilização, a oosfera é fertilizada por um gameta masculino haplóide (n)

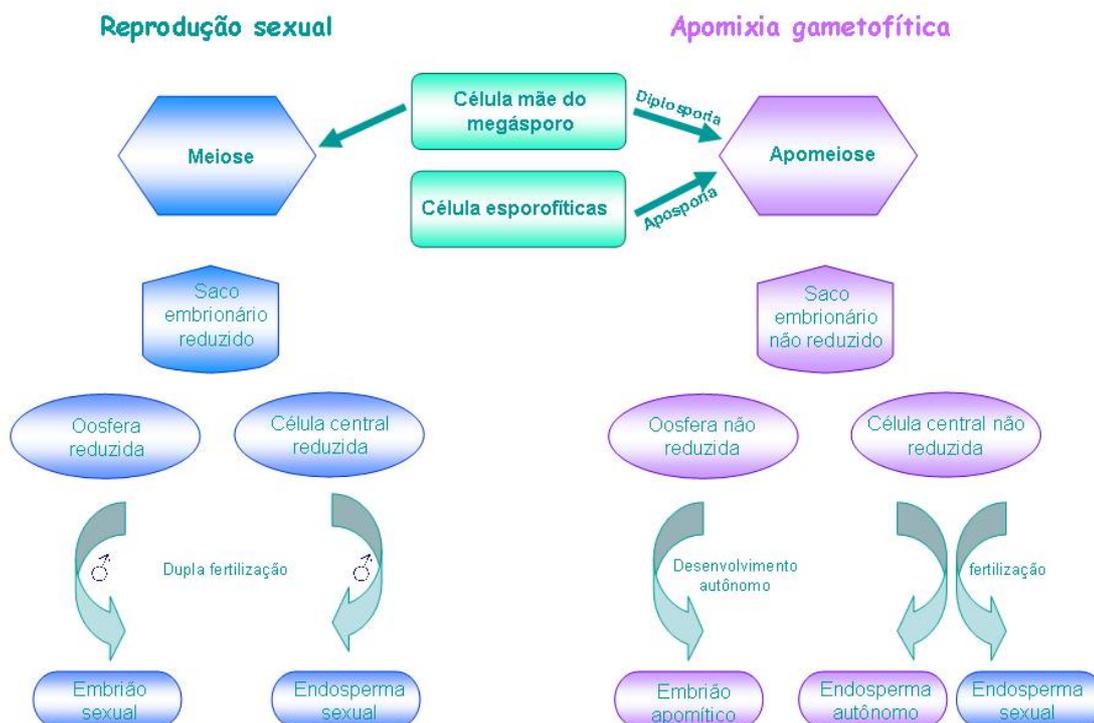
resultando em embrião diplóide ( $2n$ ). Enquanto um segundo gameta masculino também haplóide ( $n$ ) fertiliza a célula central que é binucleada para formar o endosperma triplóide ( $3n$ ), tecido que irá sustentar o embrião até a germinação (Raven et al., 1992).

O embrião e o endosperma são envolvidos pelo óvulo e resultam na semente contida no ovário. O ovário remanescente se transforma em fruto, que por sua vez protege a semente e serve de agente dispersor, garantindo a propagação da espécie (Asker, 1979; Raven et al., 1992; Raghavan, 1997)

### **1.2.2. Apomixia**

A apomixia, forma de reprodução assexual por sementes, tem forte relação com anfigmíxia e tem sido interpretada como resultado de uma variação na via de desenvolvimento da reprodução sexual (Koltunow, 1993; Vielle-Calzada et al., 1996; Grossniklaus & Schneitz, 1998).

Enquanto na reprodução sexual, ocorrem meiose e fertilização da oosfera pelo gameta masculino, na apomixia, as sementes contêm embriões formados sem a participação do gameta masculino, pelo desenvolvimento autônomo da oosfera não-reduzida (Figura 2). Asker (1979) dividiu apomixia em dois tipos: embriologia adventícia, de natureza esporofítica e apomixia gametofítica que inclui aposporia e diplosporia.



**Figura 2:** Representação esquemática das diferenças entre os modos de reprodução sexual e apomítico.

Na embriônia adventícia também conhecida como embriônia tegumentar ou nucelar os embriões são formados diretamente de células somáticas do nucelo ou do tegumento interno do óvulo (Asker & Jerling, 1992), o desenvolvimento de embrião zigótico ocorre normalmente (Naumova et al., 1993) e o sucesso dos embriões adventícios depende do endosperma resultante da fertilização do saco embrionário meiótico. A apomixia gametofítica apresenta duas etapas peculiares: (1) apomeiose - formação de sacos embrionários não reduzidos, (2) desenvolvimento autônomo do embrião. A distinção entre diplosporia e aposporia encontra-se na procedência da célula precursora do saco embrionário.

Na diplosporia, o saco embrionário é formado a partir da célula-mãe do megásporo por meio de três mitoses consecutivas, após alterações ou omissão da meiose que impedem a redução e recombinação (Naumova & Vielle-

Calzada, 2001). Nesse caso o saco embrionário possui oito núcleos não reduzidos e morfológicamente muito parecidos com aqueles encontrados nas plantas sexuais.

A aposporia é uma forma de apomixia na qual o gametófito feminino não reduzido é originado diretamente de células somáticas, do nucelo, que sofrem diferenciação e passam a ser chamadas iniciais apospóricas (Dusi & Willemse 1999; Araujo et al., 2000). Dentre os sacos embrionários apospóricos, os do tipo *Hieracium* apresentam oito núcleos em uma disposição bipolarizada, estruturalmente idêntica à do tipo *Polygonum*, e os sacos embrionários do tipo *Panicum* contém quatro núcleos, dispostos em um mesmo pólo, e são muito comuns entre os membros da família Poaceae.

#### **1.2.2.1. Histórico**

O termo apomixia foi utilizado pela primeira vez por Winkler em 1908 para descrever a reprodução assexual de forma geral, tanto em plantas quanto em animais (Asker & Jerling, 1992). Naquela ocasião, o desenvolvimento vegetativo e a viviparidade foram incluídos no conceito de apomixia. Atualmente, o termo apomixia é usado de forma restrita para descrever a formação de semente fértil onde o embrião se desenvolve sem a contribuição do material genético paterno, agamospermia (Bashaw & Hanna, 1990; Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992). Portanto os embriões gerados por meio desta forma de reprodução são considerados verdadeiros clones, uma vez que carregam a mesma informação genética contida na planta-mãe. Sabe-se que aproximadamente 400 espécies compreendidas em 35 famílias de angiospermas apresentam apomixia (Carman, 1997). Entre as angiospermas, a

apomixia tem sido bastante estudada (Nogler, 1984; Koltunow, 1993; Gordon et al., 1998), podendo ser encontrada tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas, sendo freqüentemente descrita em Poaceae, Asteraceae, Rosaceae e Rutaceae (Hanna & Bashaw, 1987; Koltunow, 1993; Koltunow et al., 1995). O relato mais recente do número de espécies caracterizadas como apomíticas foi realizado por Carman em 1997. Certamente novas espécies poderiam ser adicionadas a esta lista, visto que o estudo da apomixia tem despertado interesse com o avanço da biotecnologia (Carneiro et al., 2004). Exemplos são as espécies da família Melastomataceae, que apresenta apomixia em 39-44% das 113 espécies estudadas (Goldenberg & Werpachowski, 2004).

#### **1.2.2.2. Importância da apomixia na agricultura**

A natureza clonal da progênie de plantas apomíticas faz desse modo de reprodução um poderoso aliado para a produção de sementes e melhoramento de espécies de interesse agrônômico (Grossniklaus, 2001). As vantagens da apomixia para os programas de melhoramento incluem:

- fixação de genótipos desejados associada à propagação por sementes, permitindo que os produtores estoquem as sementes a serem plantadas na próxima safra assegurando-lhes mesmo vigor híbrido por gerações indeterminadas;
- simplificação na produção de sementes comerciais uma vez que não demanda isolamento e nem multiplicação das linhagens parentais;
- eliminação de problemas relacionados à reprodução sexual como dependência de polinizadores e possibilidade de cruzamentos;

- prevenção da transferência de vírus de plantas, processo que ocorre freqüentemente quando uma cultura é propagada de forma vegetativa, como acontece no caso da batata.

Considerando que apomixia é uma característica determinada por um ou poucos genes (Valle et al., 2004) pode-se vislumbrar a utilização de estratégias biotecnológicas na exploração desse (s) gene (s) fazendo deste modo de reprodução uma importante ferramenta para clonagem de híbridos de interesse pela simples propagação de sementes. A implantação desse sistema certamente resultaria em benefício social, industrial e refletiria de forma positiva na agricultura mundial, principalmente beneficiando os agricultores de países em desenvolvimento.

### **1.2.2.3. Apomixia facultativa**

A maioria das plantas apospóricas é descrita como apomítica facultativa (Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992) que é definida como o processo no qual plantas apomíticas retêm a capacidade de se reproduzir por sexualidade, podendo gerar progênie aberrante (Savidan, 2000; Asker & Jerling, 1992). A apomixia facultativa é caracterizada pela capacidade da planta em desenvolver sacos embrionários meiótico e apospóricos em uma mesma planta, de forma simultânea (Valle & Savidan, 1996). Nesse processo, a oosfera do saco embrionário meiótico pode ser fertilizada e gerar plantas com características genéticas totalmente diferentes da planta-mãe. O balanço entre a reprodução apomítica e sexual, nas plantas que apresentam apomixia facultativa é influenciado por fatores como genótipo parental, fotoperíodo, baixas

temperaturas (Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992). A existência da apomixia obrigatória foi questionada por Nogler (1984). Ele advertiu que o aumento no grau de apomixia para aproximadamente 100% é um indicativo de supressão na via sexual durante o desenvolvimento e ressaltou, também, a presença de traços de sexualidade em espécies onde a apomixia é tida como obrigatória. Bicknell e Koltunow (2004) relataram que em plantas apomíticas de *Hieracium piloselloides* e *H. aurantiacum*, o processo sexual é interrompido imediatamente após o aparecimento das iniciais apospóricas e, portanto, não há formação de sacos embrionários meióticos. Em *Brachiaria* o modo de reprodução é determinado pela análise morfológica dos sacos embrionários. Os acessos apomíticos que apresentam acima de 10% dos sacos embrionários do tipo Polygonum são classificados como apomíticos facultativos (Valle, 1991)

#### **1.2.2.4. Apomixia e pseudogamia**

A formação do embrião em plantas apomíticas segue um caminho apomeiótico e de desenvolvimento autônomo da oosfera, ao contrário dos embriões zigóticos que envolvem meiose e fertilização (Nogler, 1984; Naumova & Matzk, 1998). Quanto à dependência da fertilização para formação da semente, as plantas apomíticas podem ser divididas em pseudogâmicas e autônomas. A palavra pseudogamia é usada para designar o processo no qual o embrião se desenvolve independentemente da fertilização da oosfera, mas, a formação de sementes viáveis depende da fertilização da célula central para desenvolvimento do endosperma. A pseudogamia é regra entre as plantas apomíticas da família Poaceae, Rosaceae e Ranunculaceae (Berthaud, 2001). Pseudogamia foi sugerida em *Brachiaria*, a partir de experimentos de

polinização em estigmas cortados nos quais não foi observada a formação de sementes (Ngendahayo, 1988). Em 2001, Alves e colaboradores comprovaram a existência de pseudogamia em *B. brizantha* cv. Marandu por meio de experimentos de fertilização controlada; seguidos de análise morfológica da semente durante o desenvolvimento e análise citológica do endosperma. Por meio do exame de cortes morfológico após a fertilização controlada verificou-se a fusão do núcleo espermático com o núcleo da célula central; enquanto a citogenética confirmou a ploidia do endosperma resultante. Em plantas nas quais existe apomixia autônoma a formação do endosperma também independe da polinização e a esterilidade masculina é freqüente. A apomixia autônoma ocorre principalmente na família Asteraceae (Asker & Jerling, 1992; Crane, 2001).

#### **1.2.2.5. Apomixia e poliploidia**

Poliploidia é resultado de um processo evolutivo onde dois ou mais genomas são trazidos juntos para um mesmo núcleo, usualmente por meio de hibridação seguida de duplicação cromossômica (Levy & Feldman, 2002). A poliploidização em angiospermas envolve adaptações que são favorecidas pela aquisição de novas características. Estas permitem aos poliplóides colonizarem novos nichos e aumentarem as suas chances de serem selecionados para o uso na agricultura (Osborn et al., 2003). Apomíticos diplóides são raros na natureza (Nogler, 1984) e grupos apomíticos são geralmente associados à poliploidia (Carman, 1997). Indivíduos com diferentes níveis de ploidia são comuns entre as plantas que apresentam apomixia gametofítica (Asker & Jerling, 1992). No complexo agâmico *Brachiaria*, a forma diplóide exibe o modo

de reprodução sexual enquanto a forma poliplóide apresenta modo de reprodução apomítico (Valle et al., 2004). Contudo, entre as angiospermas existem outros complexos poliplóides sem nenhuma ligação com a apomixia. A poliploidia pode favorecer as condições para o desenvolvimento do modo de reprodução apomítico, mas a formação regular de sacos embrionários não reduzidos depende da presença de genes que facilitem essa via (Asker & Jerling, 1992). A relação entre apomixia e poliplóides pode ser investigada com estratégias que envolvem duplicação do número de cromossomos de plantas diplóides ou redução do número de cromossomos de plantas tetraplóides. Em *Brachiaria ruziziensis* e em *B. brizantha* a duplicação cromossômica, por tratamento com colchicina, não levou à alteração no modo de reprodução (Gobbe et al., 1981; Pinheiro et al., 2000; Araujo et al., 2005). Ao contrário, em plantas autotetraplóides induzidas de *Paspalum hexastachyum* (Quarin & Hanna, 1980), *P. notatum* (Quarin et al., 2001) e *P. rufum* (Quarin et al., 1998) foi observada presença de sacos embrionários apospóricos. Com base nos estudos acima mencionados a relação entre apomixia e poliploidia pode ser interpretada de duas formas: (1) os fatores genéticos que controlam apomixia estariam presentes nos progenitores diplóides, sexuais, porém a expressão desses fatores só seria permitida em níveis tetraplóides; (2) considerando que um único alelo dominante e ausente em plantas sexuais controla a apomixia, como sugerido para *Brachiaria* (Valle et al., 2004), apenas a duplicação cromossômica não seria capaz de mudar o modo de reprodução de sexual (aa) para apomítico (Aaaa).

### 1.2.2.6. Bases genéticas da apomixia

Vários estudos vêm sendo conduzidos para desvendar os mecanismos responsáveis pelos fenótipos que caracterizam a apomixia. Nessa linha é de fundamental importância entender os mecanismos genéticos que controlam as vias responsáveis por esses fenótipos. Mesmo somando esforços, o conhecimento genético sobre apomixia gametofítica, que é o tipo de apomixia mais estudado (Carneiro et al., 2006) é escasso (Bicknell & Koltunow, 2004). Estudos da apomixia baseados na genética mendeliana indicam que a apomixia é transmitida como uma característica qualitativa aparentemente controlada por um único locus dominante que se localiza num único locus em *Panicum maximum* (Savidan, 2000), *Ranunculus* (Nogler, 1984), *Cenchrus ciliaris* (Sherwood et al., 1994) e *Brachiaria* (Ndikumana, 1985; Lutts et al., 1994; Valle & Savidan, 1996). Em *Brachiaria*, os primeiros híbridos interespecíficos foram obtidos por meio de cruzamentos entre *B. ruziziensis*, uma sexual tetraploidizada artificialmente e apomíticas tetraplóides de *B. decumbens* ou *B. brizantha* (Ndikumana, 1985). A obtenção de progênie contendo plantas sexuais e apomíticas na proporção de aproximadamente 1:1 sustentou a hipótese de que apomixia em *Brachiaria* é controlada por um único locus. Novos cruzamentos foram conduzidos (Valle et al., 1994; Valle & Savidan, 1996) e confirmaram a herança monogênica nessa espécie. Estudos, da herança da apomixia em *Tripsacum dactiloides*, utilizando marcadores moleculares somados à teoria de *genome syntheny* entre as gramíneas mostraram ausência de recombinação no braço cromossômico que carrega o(s) gene(s) da apomixia e permitiram a Grimanelli e colaboradores (1998) sugerir que a apomeiose poderia ser controlada por um grupo de loci

interligados. A falta de recombinação no segmento cromossômico que carrega o(s) gene(s) da apomixia foi também observada em *Pennisetum* (Ozias-Akins et al., 1998). Em 1997, Pessino e colaboradores (Pessino et al., 1997) verificaram que um grupo de genes ligados, derivados do cromossomo 5 do milho, estava relacionado com o locus apospórico em *Brachiaria*. No ano seguinte, também utilizando marcadores moleculares, foi publicada a construção de um mapa da região apospórica em *Brachiaria*, evidenciando alta homologia com áreas cromossômicas em arroz e milho (Pessino et al., 1998).

Van Dijk e colaboradores (2003) sugeriram que três loci independentes sejam necessários para garantir a herança apomítica em *Taraxacum officinale*. Bicknell e Kotunow (2004) sugeriram que o número de loci que controla a apomixia tem sido subestimado em *Hieracium* e que pelo menos três fatores dominantes não ligados poderiam ser necessários para assegurar a transferência da apomixia nessa espécie. Utilizando mutações deletérias e marcadores de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) para estudar a herança em *Hieracium caespitosum*, o grupo de Bicknell obteve resultados que indicam que a apomixia nessa espécie é controlada por dois loci principais, um locus está relacionado com a apomeiose e outro com o desenvolvimento autônomo do embrião (Catanach et al., 2006).

Recentemente foi proposto um novo modelo para explicar a herança da apomixia em *Poa pratensis*. Nesse modelo cinco genes principais controlam a formação de sementes em plantas apomíticas e a diferença na penetrância e na expressividade dos alelos são fundamentais para determinar a via reprodutiva. Os componentes responsáveis pela aposporia e pelo

desenvolvimento autônomo do embrião segregariam independentemente (Matzk et al., 2005).

#### **1.2.2.7. Caracterização da apomixia: enfoque experimental**

Existem algumas características como polimorfismo morfológico, poliploidia, grau de aborto e esterilidade do pólen, que são indicativas de reprodução por apomixia (Czapik, 1994). Vários métodos podem ser utilizados para estudar o desenvolvimento apomítico. Entre esses podem ser citados: o teste de progênie; a citometria de fluxo; a microspectrometria de Feulgen; o clareamento; secções finas, semifinas e ultrafinas de ovários (Asker & Jerling, 1992; Sherwood, 2001; Czapik, 1994), e mais recentemente as várias técnicas de biologia molecular, como por exemplo, o uso de marcadores moleculares. O teste de progênie representa uma maneira direta de detectar e quantificar apomixia. Esse teste consiste da observação fenotípica de uma determinada população, sendo que a origem apomítica, indicada pela uniformidade entre os indivíduos contrapõe, a origem sexual indicada pela presença de uma população heterogênea. A utilização desta técnica é restrita a grandes populações, ao espaço dispensado e ao tempo necessário a um ciclo de crescimento. Um outro fator que deve ser considerado é a ocorrência de apomixia facultativa ou homozigose de progenitores que podem gerar erros na determinação do grau de apomixia (Valle et al., 2004). A citometria de fluxo fornece informações sobre o conteúdo de DNA (ploidia) de tecidos específicos como embrião e endosperma permitindo dessa forma avaliar a frequência de apomixia e a presença ou ausência de pseudogamia. A microspectrometria de Feulgen, como a citometria de fluxo, também fornece informação sobre ploidia

de tecidos específicos, porém permite trabalhar com amostras em estágios de desenvolvimento onde a quantidade de núcleos é restrita ou quando se quer determinar o conteúdo de DNA de núcleos individualizados, como é o caso do meiócito ou da oosfera. Em 1971, Herr desenvolveu a técnica de clareamento que desde então sofreu várias modificações e significou um avanço importante, uma vez que permite analisar diretamente a posição e divisão dos núcleos de grandes quantidades de amostras em um curto período de tempo. A utilização das secções finas, semifinas e ultrafinas permite análise detalhada de ovários, por meio de microscopia ótica e eletrônica, das estruturas e componentes químicos presentes em cada etapa do desenvolvimento permitindo estudo morfológico comparativo além da aplicação simultânea de outras técnicas como hibridização *in situ* e imunologia que permitem localizar temporal e espacialmente mRNA ou proteínas específicas. O uso de marcadores moleculares pode agilizar a identificação em larga escala de apomíticos em populações híbridas que de outra forma demandaria muito trabalho e tempo (Dusi, 2001).

#### **1.2.2.8. Estratégias de estudo da apomixia**

Apomixia tem sido extensivamente estudada com o propósito de entender os mecanismos que a controlam para, posteriormente, utilizá-los como ferramenta em programas de melhoramento. Com o propósito de identificar e caracterizar os genes responsáveis pela apomixia, duas linhas principais de pesquisa estão sendo conduzidas. Na primeira, busca-se trazer a apomixia a uma planta-modelo de reprodução sexual por mutação. Mutantes de *Arabidopsis thaliana* vêm sendo utilizados para clonagem de genes candidatos a serem usados na

engenharia da apomixia. Alguns mutantes recuperados apresentam característica de certos elementos presentes na apomixia, como produção de endosperma e início da formação do embrião na ausência de fertilização (Grossniklaus et al., 2001). Entretanto, não existe mutante que seja capaz de realizar o processo como um todo, ou seja, produzir clones por sementes (Silveira, 2004). Na segunda, estudam-se diretamente espécies naturalmente apomíticas (Silveira, 2004). Estratégias de introgressão gênica e determinação do perfil de expressão gênico de plantas apomíticas são empregadas com intuito de esclarecer os mecanismos que controlam a apomixia. Na tentativa de transferir gene (s) que confere apomixia, a técnica de hibridação foi realizada em milho (Leblanc et al., 1994) e milheto (Ozias-Akins et al., 1993). Nesse caso, nenhum híbrido verdadeiramente apomítico foi obtido e as plantas apresentaram elevado grau de esterilidade (Savidan, 2001). O primeiro híbrido relatado como apomítico, "Natsukaze", foi gerado a partir de polinização aberta entre plantas sexual e apomítica tetraplóides de *Panicum maximum* (Sato et al. 1990 in Savidan 2000).

A análise da população segregante derivada de cruzamentos entre progenitores masculinos apomíticos e femininos sexuais tem sido de grande importância para o entendimento da transmissão genética dessa característica, bem como para produzir mapas genéticos, do locus apomítico, baseados em marcadores moleculares. A clonagem do(s) gene(s) envolvido(s) na apomixia a partir desses mapeamentos ainda não foi possível. Na tentativa de entender a herança da apomixia, marcadores moleculares relacionados a essa característica foram isolados de várias espécies (Carneiro et al., 2006).

### 1.3. Estado da pesquisa e desenvolvimento da apomixia em *Brachiaria*

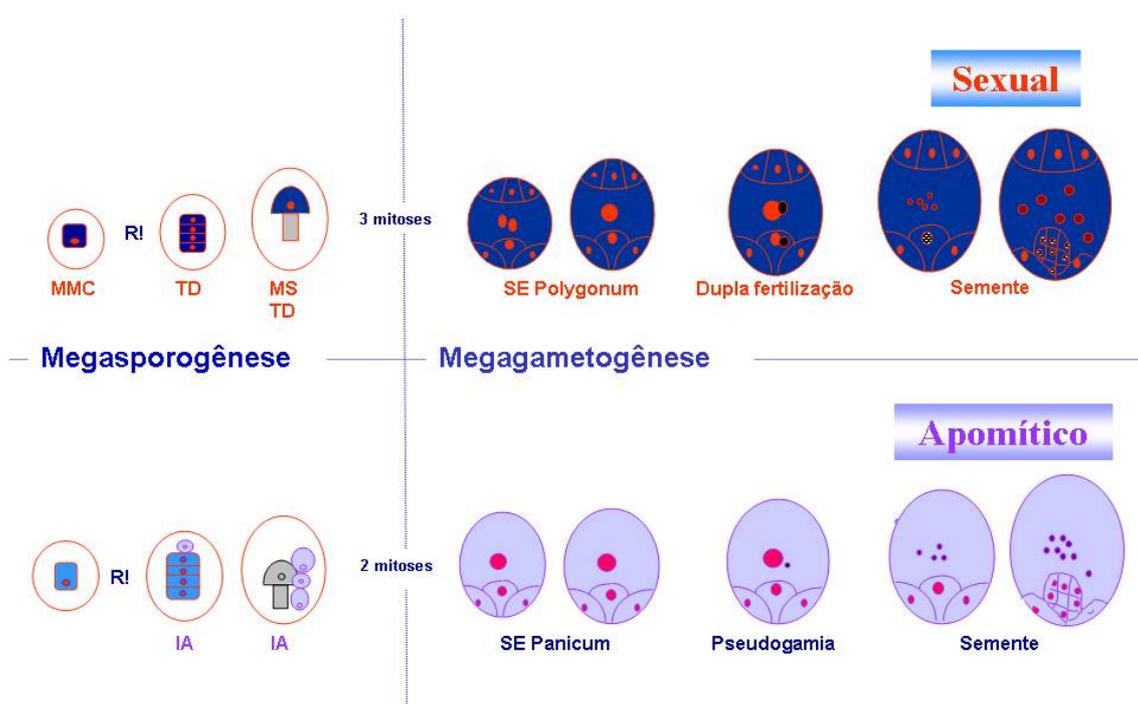
Estudos genéticos sugerem que o modo de reprodução predominante em *Brachiaria* é a apomixia (Valle & Miles, 1992), um caráter dominante que está ligado a um único locus do tipo (Aaaa). Foi postulado que plantas sexuais têm um locus recessivo para apomixia (aa) (Valle & Miles, 1994).

A utilização da técnica de marcadores moleculares forneceu forte evidência que um único gene controla a apomixia em espécies de *Brachiaria*. Para a obtenção desse dado, o DNA dos parentais – *B. ruziziensis* e *B. brizantha*, e também da progênie (F<sub>1</sub>) foram amplificados separadamente usando iniciadores randômicos de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), o perfil de co-segregação dos marcadores com o modo de reprodução corroborou com o modelo da herança monogênica em *Brachiaria* (Tohme et al., 1996). Posteriormente Pessino e colaboradores (1998) utilizaram marcadores moleculares para a construção de um mapa da região “apo” em *Brachiaria*. Nesse trabalho os autores verificaram uma ligação da região “apo” de *Brachiaria*, com o cromossomo dois de arroz e cromossomo cinco de milho. Uma alta colinearidade entre o locus apospórico de *Brachiaria* e o cromossomo cinco de milho foi verificada, sugerindo que essa região parece ser bem conservada.

Para possibilitar as análises celular e molecular, diferentes espécies de *Brachiaria* foram regeneradas por organogênese de tecido meristemático (Carneiro et al., 1995; Pinheiro et al., 2000) e embriogênese somática (Tohme et al., 1996; Manzano, 1998). Autopoliploídes foram induzidos com sucesso por aplicação de colchicina *in vitro*, em *Brachiaria ruziziensis* (Gobbe et al., 1981) e em *B. brizantha* (Pinheiro et al., 2000). A análise do comportamento meiótico

de duas plantas duplicadas de *B. brizantha* sugeriram, que assim como as plantas de *B. ruzizensis*, essas mantêm o modo de reprodução (Pozzobon et al., 1999). Recentemente foi confirmada a fertilidade de plantas de *B. brizantha* duplicadas (Araujo et al., 2005).

Os eventos iniciais da formação da semente em plantas apomíticas de *Brachiaria* foram descritos (Alves et al 2000), bem como o desenvolvimento do gametófito feminino para verificar a existência de diferenças morfológicas entre plantas sexuais e apomíticas (Figura 3) (Dusi, 2001; Araujo et al., 2000).



**Figura 3:** Representação esquemática da morfologia dos óvulos de *Brachiaria brizantha* sexual e apomítica durante o desenvolvimento da semente. MMC=célula-mãe do megásporo, R!=meiose, TD=tétrade, MS=megásporo sobrevivente, SE=saco embrionário, IA=iniciais apospóricas.

O momento de diferenciação, o posicionamento e as características morfológicas das iniciais apospóricas em plantas de *B. brizantha* (Araujo et al., 2000) e *B. decumbens* (Dusi, & Willemse, 1999) foi determinado. Em *B. decumbens*, o aparecimento das iniciais apospóricas é precoce em relação a *B. brizantha*. Enquanto em *B. decumbens*, as iniciais apospóricas começam a surgir concomitantemente com a célula-mãe do megásporo ou meiócito (Dusi & Willemse, 1999), em *B. brizantha* as iniciais apospóricas foram detectadas quando tétrades de megásporo já estão presentes no óvulo (Araujo et al., 2000).

Em *B. decumbens* nos estágios precoces do desenvolvimento do óvulo foi observada alteração no padrão de deposição de calose. A calose ( $\beta$ 1-3 glucano) é um carboidrato complexo constituinte da parede celular (Raven et al., 1992) que está presente na parede do meiócito e durante a divisão é detectado na parede de micrósporos e megásporos (Dusi, 2001). Segundo Carman e colaboradores (1997), a ausência desse carboidrato circundando a célula-mãe do megásporo em apomíticas, pode ser consequência da expressão de fatores que culminam com a apomixia. Por meio da atividade e localização de enzimas que degradam a sacarose, como a invertase e a sacarose sintase, o nível de carboidratos durante o desenvolvimento do óvulo em plantas sexuais e apomíticas de *B. decumbens* foi determinado. Durante os estágios iniciais de desenvolvimento, momento crucial da diferenciação entre o modo de reprodução apomítico e sexual, houve uma interrupção no metabolismo de carboidratos em óvulos de plantas apomíticas, sugerindo que essa condição pode influenciar na decisão celular para que ocorra apomixia (Dusi, & Willemse, 1999).

Também com o intuito de localizar diferenças e similaridades entre o modo de reprodução sexual e apomítico foi feita uma investigação para determinar o padrão de distribuição de RNA total e RNA mensageiro durante o desenvolvimento de óvulos de plantas de *B. decumbens* sexual e apomítica. A quantidade e distribuição de RNA total e RNA mensageiro foram diferentes em óvulos de planta sexual e apomítica nos estágios precoces do desenvolvimento. A principal diferença detectada foi em relação à célula-mãe do megásporo de plantas apomíticas, onde foi detectada maior quantidade de RNA poli A<sup>+</sup> e uma considerável quantidade ficou confinada ao núcleo (Dusi, 2001).

Estudos morfológicos e citogenéticos de plantas apomíticas, cv. Marandu ( $2n=4x=36$ ) confirmaram a presença de pseudogamia em *Brachiaria* (Alves et al., 2001) previamente sugerida por Ngendahayo (1998). Análises citológicas mostraram o momento da fertilização, caracterizado pela fusão do núcleo espermático com o núcleo polar enquanto a análise citogenética evidenciou a presença de 52 a 54 cromossomos nas células do endosperma, confirmando a presença de um tecido triploide, resultante da fertilização do núcleo polar não reduzido por um núcleo espermático reduzido (Alves et al., 2001). Estudo do desenvolvimento da cariopse de cv. Marandu revelou que morfológicamente o desenvolvimento do embrião partenogênético é similar ao zigótico de outras gramíneas (Alves, 2000). Os diferentes estágios de desenvolvimento do saco embrionário estão relacionados ao comprimento e aspecto dos pistilos e ovários, associados à maturação de *B. decumbens* (Dusi, & Willemse, 1999) e *B. brizantha* (Araujo et al., 2000). Essas características foram usadas na separação de ovários em estágios específicos da megasporogênese ou

megagametogênese, por associação de grupos de ovários com características similares.

A introdução de genes em plantas pode ser realizada por técnica conhecida como transformação genética. Atualmente, a transformação genética é realizada principalmente via *Agrobacterium* ou biobalística. O êxito da transformação está atrelado à regeneração e manutenção in vitro da espécie em questão (Carneiro et al., 2004). Um método de transformação por biobalística para diferentes espécies de *Brachiaria* foi estabelecido no final dos anos 90 (Manzano, 1998; Lentini et al., 1999). Com a finalidade de aperfeiçoar esse método, Silveira e colaboradores (2003) fizeram avaliação de seis promotores (Act1, Ubi1, Act2p, CaMV3, CsVMV e Ubi3) e estabeleceram que para *Brachiaria*, os promotores de monocotilidôneas Act1, de arroz e Ubi1, de milho são mais eficientes. Trabalhos visando melhorar a eficiência de regeneração e manutenção in vitro (Cabral et al., 2003; Santana, 2006) estão sendo desenvolvidos.

O padrão de expressão gênica em ovários em estágio precoce de desenvolvimento que corresponde a megasporogênese, e em estágio tardio que corresponde a megagametogênese de acessos apomítico tetraplóide e sexual diplóide de *B. brizantha* foi comparado utilizando a técnica de *Differential Display Polymerase Chain Reaction* (DDPCR). Sessenta combinações de iniciadores produziram aproximadamente 4.320 fragmentos de cDNA. Desses, 65 fragmentos, aqueles que tinham entre 150 e 950 pb, foram clonados, seqüenciados e submetidos à *northern* reverso para confirmar o caráter diferencial. Foram determinados os clones específicos do acesso sexual

e apomítico em diferentes fases de desenvolvimento como mostra a tabela 1 (Rodrigues et al., 2003).

**Tabela 1:** Especificidade da hibridização por *northern* reverso dos cDNAs isolados por DD-PCR, referentes à amostras de ovários coletados em estágios de megasporogênese ou megagametogênese de plantas apomítica (A) e sexual (S) de *Brachiaria brizantha*.

Clones	megasporogênese		megagametogênese	
	A	S	A	S
5	+	-	+	-
7	-	+	++	+
10	+++	+	++	++
18	-	-	+	-
20	++		-	-
29	+	-	+++	+
30	+	-	+++	+++
34	+	-	++	-
38	+++	+	+++	+++
56	-	-	-	+
64	-	++	+	++

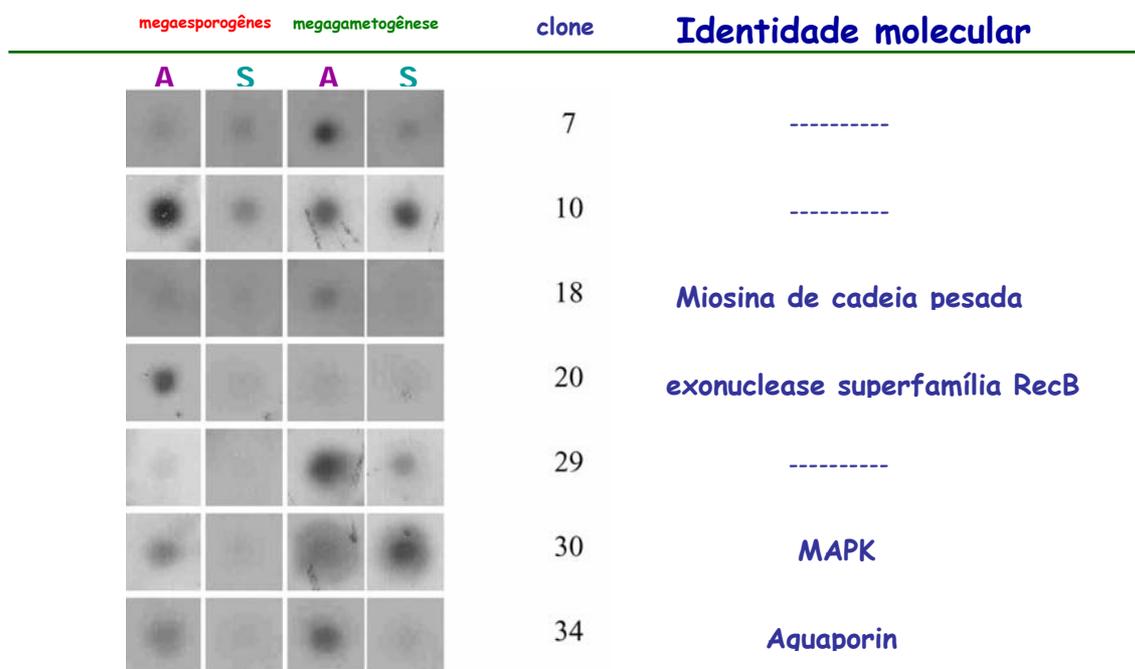
- ausência de sinal, + sinal fraco, ++ sinal forte, +++ sinal muito forte.

Baseado em Rodrigues et al 2003.

Seqüências de cDNA foram similarmente isoladas de óvulos de *B. decumbens* (Dusi, 2001). A análise dessas seqüências por hibridização *in situ* revelou um padrão diferente de expressão em óvulos de plantas sexuais ou apomíticas, que pode estar relacionado ao desenvolvimento autônomo do embrião.

A ocorrência de apomixia em espécies, como *Brachiaria*, que conservaram a habilidade de se reproduzir por sexualidade fornece oportunidade ímpar para delineamento comparativo, tanto para estudos estruturais, quanto para estudos genéticos e moleculares. Comparações, ao longo do desenvolvimento, entre sacos embrionários sexuais e apomíticos representam um sistema adequado para desvendar as diferenças que irão especificar se um saco embrionário seguirá a via apomítica ou sexual. No presente trabalho, sete dos onze clones

caracterizados por Rodrigues e colaboradores em 2003 foram selecionados com base no perfil de expressão, em momentos decisivos para a diferenciação da apomixia, para estudo do perfil de expressão pela técnica de hibridização *in situ*, sendo que um desses, o denominado clone 20, por apresentar um sinal forte e específico de ovários em megasporogênese de planta apomítica foi selecionado para ser amplificado por 5'RACE. Ente os clones selecionados, alguns apresentaram identidade molecular com proteínas como mostra a figura 4.



**Figura 4:** Especificidade da hibridização por *northern* reverso dos cDNAs isolados por DD-PCR (Rodrigues et al 2003) utilizados no presente trabalho, mostrando o perfil de expressão de amostras de ovários coletados em estágios de megasporogênese ou megagametogênese de plantas apomítica (A) e sexual (S) de *Brachiaria brizantha* e a identidade molecular determinada por análise em bancos de dados.

#### **1.4. Fertilização in vitro**

A implementação de técnicas de fertilização in vitro em *Brachiaria* foi iniciada em 2004, nesse mesmo ano foi publicado um capítulo sobre o *Estudo da polinização e fecundação no gênero Brachiaria*, apresentado no anexo 1.

Em *Brachiaria*, o desenvolvimento de uma técnica de fertilização in vitro eficiente será de grande valia nos estudos comparativos entre os modos de reprodução sexual e apomítico presentes nessa espécie. O principal benefício desse sistema advém da possibilidade de controlar minuciosamente as condições de estudo, oferecendo a oportunidade de avaliar passo a passo as etapas envolvidas no processo de polinização e fertilização que culmina com a geração de sementes em plantas apomíticas e sexuais. Acompanhar morfologicamente etapas como a descarga, a migração e o destino dos núcleos masculinos dentro do saco embrionário, e estudar a expressão dos genes envolvido em cada uma dessas etapas contribuirá para esclarecer questões fundamentais no entendimento dos mecanismos diferenciais entre a apomixia e sexualidade. Além de gerar conhecimento básico que contribuirá para o programa de melhoramento nessa e em outras gramíneas de interesse agrônômico, a técnica de fertilização in vitro possibilita cruzamentos que seriam inviáveis in vivo devido a alguma incompatibilidade pré-zigótica.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Contribuir para o progresso da pesquisa em apomixia bem como em reprodução de plantas de uma maneira geral, utilizando análises celulares e moleculares e desenvolvendo estratégias de manipulação da reprodução de plantas de *Brachiaria* naturalmente apomíticas.

### 2.2. Objetivos específicos

Inferir a função de seqüências de cDNA envolvidas no processo de diferenciação da apomixia em *Brachiaria* pela análise de sua expressão espacial e temporal in situ durante o desenvolvimento do óvulo e estabelecer condições experimentais da fertilização in vitro.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram coletados: ovários, anteras, folhas, e raízes de diferentes acessos apomíticos e sexuais de *Brachiaria* (Tabela 2), cultivadas no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Brasília-DF e Embrapa Gado de Corte; Campo Grande-MS.

**Tabela 2:** Origem do material vegetal utilizado nos experimentos deste trabalho.

<b>Acesso (Ploidia)</b>	<b>Modo de reprodução</b>	<b>Material coletado</b>
<i>B. brizantha</i> - BRA 00591 (2n=4X=36)	apomixia	ovários, anteras, folhas, e raízes
<i>B. brizantha</i> B105 - BRA 00274 (2n=2X=18)	sexual	ovários, anteras, folhas, e raízes
<i>B. decumbens</i> D4 - BRA 004430 (2n=2X=18)	sexual	ovários e anteras
<i>B. decumbens</i> D58 - BRA 000191 (2n=4X=36)	apomixia	ovários e anteras
<i>B. decumbens</i> D62 (2n=4X=36)	apomixia	ovários e anteras
<i>B. ruziziensis</i> - R50 (2n=2X=18)	sexual	ovários e anteras
<i>B. ruziziensis</i> -R112 (2n=2X=18)	sexual	ovários e anteras
<i>B. ruziziensis</i> -R44 (2n=4X=36)	apomixia	ovários e anteras
<i>B. brizantha</i> B112 (2n=4X=36)	apomixia	ovários e anteras
<i>B. brizantha</i> - B291 (2n=4X=36)	apomixia	ovários e anteras
<i>B. humidicola</i> - B. hum. (2n=4X=36).	apomixia	ovários e anteras

## **3.2. Hibridização in situ**

### **3.2.1. Preparo das lâminas**

Lâminas de vidro foram lavadas e fervidas, por aproximadamente 20 min, com extran 5% em água (v/v), enxaguadas em água corrente por aproximadamente 2 h, e enxaguadas novamente em água destilada. As lâminas ficaram em estufa a 42°C durante a noite. Após secagem as lâminas foram tratadas com álcool etílico 96% e incubadas a 180°C por 4 h. Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma raque de vidro e incubadas em Poly-L-Lisyne (Sigma-Aldrich Co.) 0,1% em água tratada com di-etil-pirocarbonato (DEPC) (v/v) por 5 min. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por 14 h e estocadas a -20° C.

### **3.2.2. Preparo do tecido**

Racemos foram coletados de plantas com o auxílio de tesoura de poda, colocados em frascos com água e levados ao laboratório. Ovários em diferentes estágios de desenvolvimento (Araujo et al., 2000) foram coletados, com o auxílio de microscópio estereoscópico Zeiss-Stemi SV11, colocados em solução fixadora contendo glutaraldeído 0,25%, paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2 sob vácuo por 1 h à temperatura ambiente. A solução fixadora foi trocada e os ovários mantidos na nova solução por 4 h à temperatura ambiente.

As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01M e em seguida desidratadas em série crescente de álcool etílico (30, 50, 70, 90 e 100%), 30 min cada; embebidas em série crescente de álcool etílico: butil-metil-metacrilato (BMM) (5:1, 5:2, 5:3, 5:4, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5; v/v) e BMM puro

(duas trocas) por pelo menos 4 h cada passo. Cada ovário foi colocado em uma cápsula plástica contendo BMM e polimerizado a 4°C por 48 h sob luz ultravioleta 815 2537 A° (15 watts). Após polimerização as amostras foram estocadas a 4°C. Secções de 3,0 - 3,5 µm foram obtidas utilizando um ultramicrótomo Leica Ultracut-UCT e colocadas sobre lâminas previamente cobertas com Poly-L-Lisyne. As secções foram colocadas sobre gotas de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC, esticadas com vapor de clorofórmio e colocadas por 1-2 h a 60°C. Para remoção do BMM, as lâminas foram mergulhadas duas vezes em acetona 100% (10 min cada), acetona: água tratada com DEPC (1:1; v/v) por 10 min e duas vezes em água tratada com DEPC (10 min cada).

### **3.2.3. Teste com laranja de acridina**

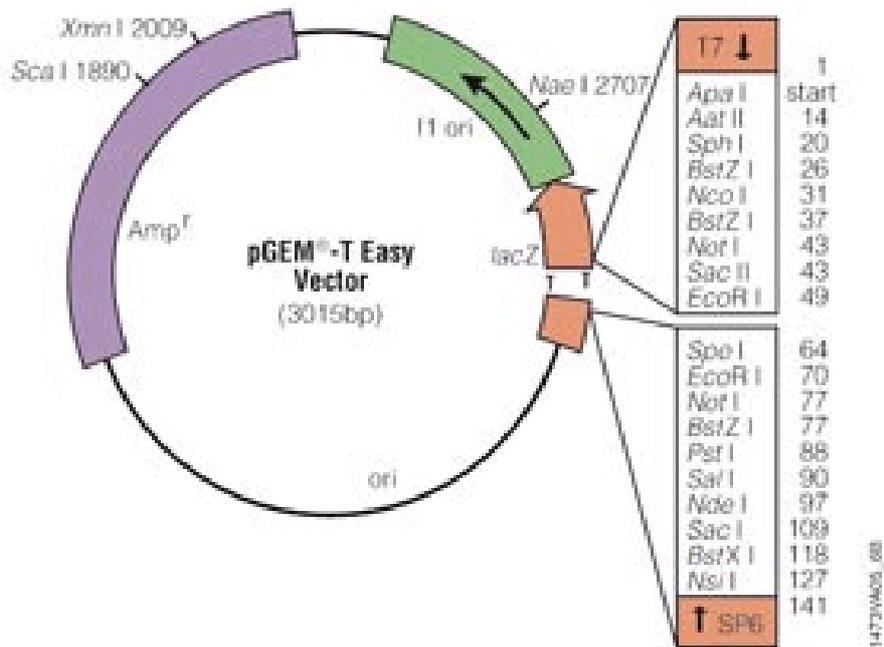
Para verificar a preservação do RNA presente no tecido ovariano, algumas secções foram coradas com laranja de acridina (AO) 0,05% em tampão acetato pH 2,1 na ausência de luz, por 30 min, e enxaguadas em tampão *veronal acetate* pH 7,8 (Bimal & Willemse, 1996) por 15 min. Estas secções foram examinadas sob luz ultravioleta emitida na faixa de 395 nm ou 510 nm e fotodocumentadas em microscópio de epi-fluorescência Zeiss-Axiophot.

### **3.2.4. Síntese das sondas marcadas com digoxigenina**

Foram utilizadas como molde para a confecção das sondas de mRNA fragmentos de cDNA identificados como diferencialmente expressos durante o desenvolvimento do ovário de plantas apomítica e sexual de *B. brizantha* (Rodrigues et al 2003). Os fragmentos clonados no vetor pGEM® -T *Easy Vector Systems* (Invitrogen) (Figura 5) foram mantidos em bactérias XL1 *Blue*

de *Escherichia coli* estocadas em glicerol 20% a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a confecção das sondas, as culturas de bactérias contendo o inserto de cDNA clonado no vetor foram reativadas em meio LB (Luria-Bertani - triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5) líquido com ampicilina  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  e em seguida o DNA plasmidial foi extraído como descrito a seguir (item 3.10). As sondas de mRNA, senso e anti-senso, foram sintetizadas por transcrição in vitro, a partir dos fragmentos de cDNA clonados no vetor “pGEM<sup>®</sup> -T Easy”, utilizando o *DIG RNA Labeling Kit* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante.

Os plasmídios contendo os fragmentos de cDNA 7, 10, 18 (18=*BbrizMYO*), 20 (*BbrizREC*) e 30 (*BbrizMAPK*) foram linearizados por digestão com *SpeI* ou *NcoI*. Os vetores contendo os fragmentos de cDNA 29 e 34 (34=*BbrizAQP*) foram linearizados com *SaII* ou *NcoI*. A transcrição da sonda senso ou anti-senso foi realizada utilizando T7 ou SP6 polimerase respectivamente. Antes da reação de transcrição os plasmídios linearizados foram purificados em fenol: clorofórmio (1:1; v/v) seguido de lavagem em clorofórmio puro. A precipitação foi realizada com NaAc 3M, pH 5,5:álcool etílico 100% (1:10; v/v), a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 1 h ou a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2h30min. O precipitado foi lavado com álcool etílico 70%, secado ao ar livre, re-suspendido em  $25\ \mu\text{L}$  de água DEPC e estocado à  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 5:** Mapa do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy utilizado para a clonagem dos produtos do DDPCR. O vetor possui 3015pb, Promotores T7 e SP6 flanqueando o sítio múltiplo de clonagem com o gene *lacZ*, gene da betagalactamase (*Amp<sup>r</sup>*) e origem de replicação do plasmídio (*ori*). Vetor adquirido na forma linear e possui na extremidade 3' um resíduo de timina (T) que propicia a clonagem de produtos de PCR contendo resíduos de adenina (A) nas extremidades (Pomega<sup>®</sup>)

### 3.2.5. *Dot blot*

Para conferir a marcação e estimar a quantidade de sonda sintetizada foi realizado um *dot blot*. Uma membrana de *Nylon Hybond N* (Amersham Biosciences) foi mergulhada em Tris-(hidroximetil)-aminometano 10 mM, pH 7,5 (Tris-HCl) por 1 min. Após retirar o excesso do Tris-HCl, foi adicionado 1  $\mu$ L da sonda sintetizada e 1  $\mu$ L do RNA controle *DIG RNA Labeling Kit* (Roche) em duas concentrações (10 e 100 ng). O material foi fixado à membrana sob luz ultravioleta - UV Stratalinker<sup>®</sup> 2400 (Stratagene). Após lavagem em tampão de detecção I (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5; NaCl 0,15 M) a membrana foi incubada por 30 min no tampão de detecção II (*bovine serum albumin* (BSA) 2% em tampão I). Em seguida a membrana foi incubada com *Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* (Roche) diluído 1:5000 em tampão de detecção I por 1 h e incubada na solução de coloração contendo 15  $\mu$ L de *5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt* - BCIP (0,05 g/mL) e 15  $\mu$ L de *Nitro-Blue Tetrazolium Chloride* - NBT (0,05 g/mL) em 5 mL de tampão de detecção III por cerca de 30 min no escuro. A reação de coloração foi finalizada pela adição do tampão de detecção IV (Tris-HCl 0,1M pH 8,0; ácido etileno diamino tetraacético (EDTA) 1 mM). A estimativa da quantidade de sonda marcada foi determinada com base na comparação da intensidade de coloração dos pontos entre a sonda sintetizada e o RNA controle marcado com digoxigenina (fornecido pelo Kit).

### 3.2.6. Reação de hibridização

As secções foram incubadas com 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL<sup>®</sup>), 60 ng de sonda em 100  $\mu$ L de tampão de hibridização [Tris-HCl 10 mM pH 7,5;

NaCl 300 mM; formamida 50%; EDTA 1 mM pH 8,0; mistura de Denhardt (solução de Denhardt 100X = Polyvinylpyrrolidone 2%; BSA 2% e Ficoll™ 400 2%) 1X; sulfato de dextran 10%]. As secções foram colocadas em câmara úmida a 42°C, no escuro, por um período de 15 h.

### 3.2.7. Reação de pós-hibridização e detecção imunológica

Após incubação com a solução de hibridização as secções foram lavadas em SSC 4X, SSC 2X, SSC 1X e SSC 0,5X (SSC 20X = 3M NaCl; 0,3M Na<sub>3</sub>-citrato, pH 7,0), por 30 min cada. Em seguida foram lavadas por 5 min em tampão de detecção I (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M) e incubadas por 30 min no tampão de detecção II (BSA 2% em tampão I). As secções foram novamente lavadas em tampão de detecção I por 5 min e incubadas com *Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* (Roche) diluído 1: 1000 em tampão de detecção I por 2h30min. Após duas lavagens seguidas, de 15 min, em tampão de detecção I e uma lavagem em tampão de detecção III (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M; com pH final ajustado para 9,5) as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5µL de BCIP (0,05 g/mL) e 4,5 µL NBT (0,05 g/mL) em 1 mL de tampão de detecção III por 1 h, no escuro. Para finalizar a reação de coloração, as secções foram incubadas em tampão de detecção IV (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 1 mM) por 10 min. Finalmente as secções foram lavadas em água bi-destilada, desidratadas em série crescente de álcool etílico (30, 50, 70, 90 e 100%); álcool etílico:xileno (1:1; v/v) e xileno puro por 30s cada. As lâminas, contendo as secções, foram montadas com Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific). Após secarem ao ar livre as

lâminas foram observadas e fotodocumentadas em microscópio de Luz Zeiss-Axiophot.

### **3.3. Extração de RNA**

#### **3.3.1. Coleta de ovários para extração de RNA**

Racemos *B. brizantha* apomítica e sexual foram coletados no campo e imediatamente colocados em água. No laboratório os ovários foram extraídos sob microscópio estereoscópico Zeiss-SV11, utilizando-se pinça e bisturi *RNase free* e imediatamente colocados em tubos de micro-centrífuga de 1.5 mL (250 ovários/tubo) mantidos em nitrogênio líquido e estocados a -80°C.

#### **3.3.2. Extração de RNA total**

A extração de RNA total foi realizada utilizando o método de extração por reagente Trizol® (Invitrogen). Para cada tubo, contendo 250 ovários, foram adicionados 250 µL do reagente Trizol®. Em seguida, os ovários foram macerados por 30 s com um pistilo de polietileno acoplado a uma broca (AD1-18 s *Bionic Drill set*). Após a maceração foram adicionados 25 µL de uma solução contendo clorofórmio 100% e álcool isoamílico 100% (24:1; v/v). Após agitação, em agitador de tubos tipo vortex, por 30 s o material foi incubado por 5 min no gelo, e centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e a ela foi adicionado o mesmo volume de álcool isopropílico. Após 30 min no gelo, o material foi centrifugado a 13.000 rpm, por 30 min, à 4°C. Em seguida, o precipitado foi lavado com 500 µL de álcool etílico 70%, centrifugado a 12.000 rpm, por 5 min, a 4°C, seco ao ar livre, e finalmente re-suspendido em 10 µL de água bi-

destilada, tratada com DEPC e autoclavada. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1.2% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5X.

### **3.3.3. Purificação de RNA poli-A<sup>+</sup> de ovários de *Brachiaria brizantha***

O RNA poli-A<sup>+</sup> foi isolado do RNA total utilizando o *Kit Dynabeads<sup>®</sup> Oligo (dT)<sub>25</sub>*, segundo instruções do fabricante. Para a extração de RNA poli-A<sup>+</sup>, foram utilizados 45 µg e 100 µg de RNA total, extraídos de ovários do acesso apomítico, estágio I/II e IV respectivamente, num volume final de 100 µL de água bidestilada. Primeiro, o RNA total foi aquecido a 65°C por 2 min posteriormente, adicionou-se ao RNA, previamente aquecido, 200 µL de suspensão de Dynabeads<sup>®</sup>, previamente lavados com tampão de ligação 2X. Após incubar por 5 min à temperatura ambiente, o material foi colocado no MPC (concentrador magnético de partículas - Dynal<sup>®</sup>) por 30 s. O material não ligado foi então descartado com o sobrenadante e os *beads* foram lavados, por três vezes, consecutivas, com tampão de lavagem B. Para eluir o RNA poli-A<sup>+</sup>, foram adicionados aos *beads* 6 µL de Tris-HCl pH 7,5 (livre de RNase). Esta solução foi aquecida a 80°C por 2 min e imediatamente colocada no MPC. Finalmente, o sobrenadante contendo o mRNA, foi resgatado e transferido para um tubo novo. O RNA poli-A<sup>+</sup> foi estocado a -80°C para posterior utilização.

### **3.4. Extensão terminal 5' de cDNA por 5'RACE - Rapid amplification of cDNA ends**

As reações de 5'RACE foram realizadas utilizando o *Marathon TM cDNA Amplification Kit* (Clontech) seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.4.1. Síntese da primeira fita de cDNA

Num tubo de micro-centrífuga de 0.5 mL foram adicionados: 3  $\mu\text{L}$  ( $\sim 2 \mu\text{g}$ ) de RNA poli-A<sup>+</sup>, 1  $\mu\text{L}$  de cDNA *synthesis Primer* (10  $\mu\text{M}$ ) e 2  $\mu\text{L}$  de água bidestilada. Após incubação a 70°C por 2 min a mistura foi colocada no gelo por 2 min e acrescida de 2  $\mu\text{L}$  de 5X *First-Strand Buffer*, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP *mix* (10 mM) e 1  $\mu\text{L}$  de AMV *Reverse Transcriptase* (20 unidades/ $\mu\text{L}$ ). A mistura foi incubada a 42°C por 1 h e colocada no gelo para proceder imediatamente à síntese da segunda fita de cDNA.

### 3.4.2. Síntese da segunda fita de cDNA - 5'RACE

Foram adicionados ao tubo contendo os 10  $\mu\text{L}$  da reação de síntese da primeira fita: 48,4  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril, 16  $\mu\text{L}$  de 5X *Second-Strand Buffer*, 1,6  $\mu\text{L}$  de dNTP *mix* (10mM) e 4  $\mu\text{L}$  de 20X *Second-Strand Enzyme Cocktail*. Após incubar a 16°C por 1h30min a reação foi acrescida de 2  $\mu\text{L}$  (10 unidades) de T4 DNA Polimerase e novamente incubada por 45 min a 16°C. Para terminar a síntese da segunda fita de cDNA, foram adicionados à reação 4  $\mu\text{L}$  de EDTA/*Glycogen mix*. A reação foi acrescida de 100  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril e transferida para um tubo de 1,5 mL para posterior limpeza.

### 3.4.3. Purificação da segunda fita de cDNA

A reação de síntese da segunda fita de cDNA foi submetida à extração com fenol pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1). A mistura foi agitada em agitador de tubos tipo vortex por 30 s e centrifugada a 14000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um

tubo novo, acrescida de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Realizou-se uma nova homogeneização e centrifugação, nas condições descritas acima. A fase aquosa foi resgatada e acrescida de 75  $\mu\text{L}$  (0,5 v) de acetato de amônio 4 M, 375  $\mu\text{L}$  (2,5 v) de álcool etílico 95% - à temperatura ambiente e centrifugada a 14000 rpm por 20 min. O precipitado foi lavado com 300  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 80%, centrifugado a 14000 rpm por 10 min, seco a temperatura ambiente, e re-suspendido em 10  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril. A quantidade de cDNA fita dupla purificada foi estimada por espectrofotometria - *BioPhotometer* (Eppendorf) e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1.2% corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em tampão TBE 0.5X.

#### **3.4.4. Ligação do adaptador 5' RACE ao cDNA fita dupla (ds cDNA)**

Em um tubo de 0,5  $\mu\text{L}$  combinou-se: 5  $\mu\text{L}$  de cDNA fita dupla, 2  $\mu\text{L}$  de *Marathon cDNA Adaptor* (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de 5X *DNA Ligation Buffer* e 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase (400 unidades/ $\mu\text{L}$ ). Essa mistura foi incubada a 16°C *overnight* e aquecida a 70°C por 5 min para desativar a ligase. Procedeu-se à diluição do cDNA ligado ao adaptador para 0,4 ng/ $\mu\text{L}$  em *Tricine-EDTA Buffer* e estocagem a -20°C. Após uma nova diluição para 0,1 ng/ $\mu\text{L}$ , no mesmo tampão, o cDNA ligado ao adaptador foi desnaturado a 94°C por 2 min, imediatamente colocado no gelo por 2 min e em seguida estocado a -20°C até ser utilizado na reação de 5' RACE.

### 3.4.5. Desenho dos iniciadores específicos para o experimento de 5' RACE

Os iniciadores específicos foram desenhados no sentido anti-senso utilizando o programa *PRIMER DESIGNER version 2.0* (Copyright 1990, 91. Scientific & Educational Software). Antes de proceder à reação de 5'RACE os iniciadores específicos foram testados utilizando como molde, a seqüência de cDNA clonada no vetor pGEM-T Easy (Invitrogen). As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas na reação 5' RACE. As seqüências e características dos iniciadores utilizados estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3:** Características principais dos iniciadores utilizados para o 5'RACE PCR. Os iniciadores CDS, AP1 e AP2 são providos pelo *Marathon TM cDNA Amplification Kit* (Clontech) e os demais são específicos para os cDNAs de interesse – *BbrizREC* ou *BbrizMYO*.

Identificação	seqüência	tamanho	Tm
CDS	5' T(30)NN 3'	32bases	-
AP1	5' CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	27 bases	71 °C
AP2	5' ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC 3'	23 bases	77 °C
Clont20	5' CTGCACTTCCACCTCTCGTCTTCA 3'	25 bases	78°C
Clone20lu	5' GGTCTTTGCACTGAATCCCAGTGAGC 3'	26bases	78°C
Rev75	5' GAATGGTCTGCCTGTAGTTC 3'	20bases	65°C

#### **3.4.6. Reação de 5' RACE**

As reações de polimerase em cadeia foram realizadas num volume final de 50  $\mu\text{L}$ . A um tubo de 0.5 mL foram adicionados 36  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril, 5  $\mu\text{L}$  de 10X Advantage2 buffer, 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM) e 1  $\mu\text{L}$  de Advantage2 polymerase mix (50X). Após agitação em agitador de tubos tipo vortex e centrifugação rápida (30 s), acrescentou-se ao tubo 5  $\mu\text{L}$  de cDNA dupla fita ligado ao adaptador (0,1 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de iniciador AP1 (10  $\mu\text{M}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  do iniciador específico do gene de interesse (10  $\mu\text{M}$ ). Em seguida, cada reação foi acrescida de duas gotas de óleo mineral e submetida aos seguintes parâmetros de amplificação: 94°C por 1 min, 5 ciclos de 94°C por 30 s e 72°C por 4 min, 5 ciclos de 94°C por 30 s e 70°C por 4 min e 35 ciclos de 94°C por 20 s e 68°C por 4 min. Em um termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.). O produto desta reação foi analisado em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### **3.4.7. Purificação dos produtos da reação de 5' RACE**

Os fragmentos de DNA de interesse foram recortados do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova, colocados em tubos de micro-centrifuga de 1,5 mL, pesados e purificados de acordo com o QIAEX II Kit (Quiagen).

#### **3.4.8. Preparo de *E. coli* eletrocompetentes**

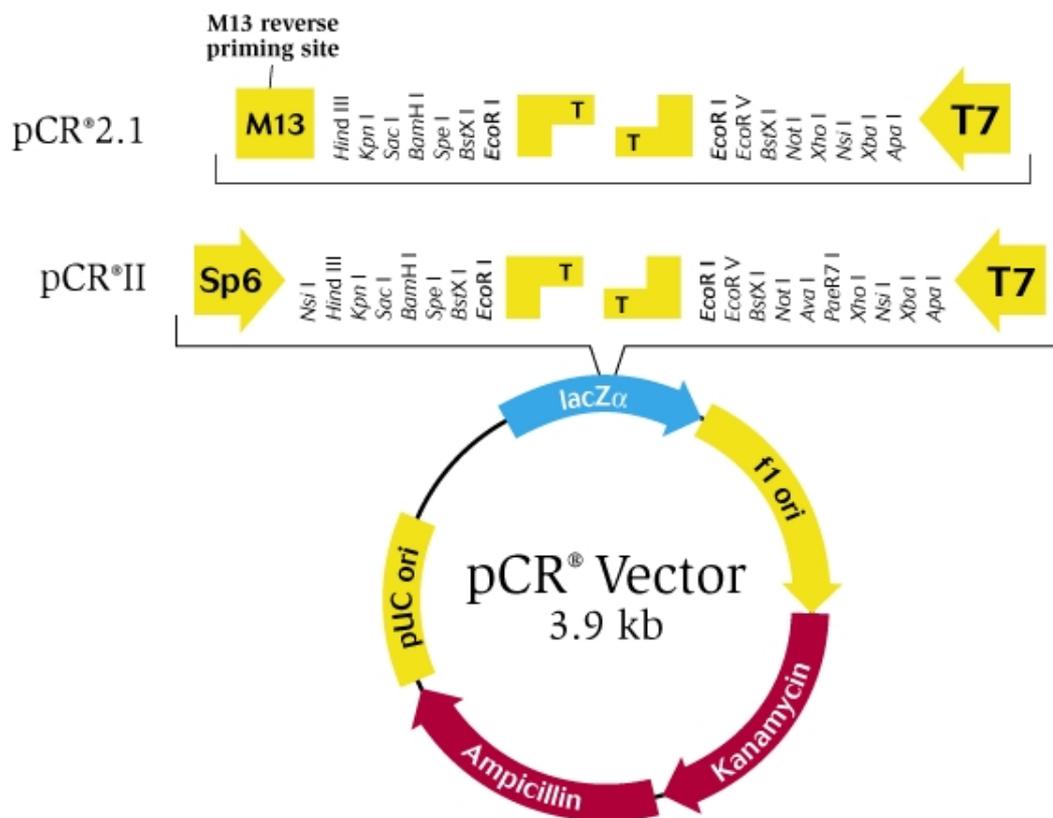
O protocolo utilizado foi adaptado de Sambrook et al 2001 (Sambrook & Russel, 2001). Colônias isoladas foram crescidas em 5 mL de meio LB líquido a 37°C sob agitação (220 rpm) por aproximadamente 16 h. Foram incubados 5 mL desta cultura em 500 mL de meio LB líquido e incubado a 37°C sob

agitação vigorosa (250 rpm) até atingir uma absorbância à 600nm de 0,5. A cultura foi dividida em tubos estéreis de 250 mL e resfriada em banho de gelo durante 15-30 min. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 min numa centrífuga (Sorvall® RC-5B) com temperatura ajustada para 4<sup>o</sup>C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento re-suspendido em 125 mL de H<sub>2</sub>O bi-destilada estéril e gelada. As células foram submetidas a uma etapa de centrifugação sob as mesmas condições descritas acima. Novamente o sobrenadante foi descartado e o sedimento re-suspendido em 10 mL de glicerol 10% (v/v) gelado. As células em suspensão foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 15 min a 4<sup>o</sup>C, o glicerol foi descartado e as células sedimentadas foram re-suspendidas em 1 mL de glicerol 10% gelado. As células, agora competentes, foram distribuídas em alíquotas de 40 µL em tubos de micro-centrífuga de 1,5 mL, imediatamente depositadas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 <sup>o</sup>C para uso posterior.

#### **3.4.9. Clonagem e transformação dos produtos da reação de 5' RACE**

Após serem purificadas as bandas de interesse foram clonadas no pCR<sup>®</sup> 2.1 3.9 Kb (Invitrogen) (Figura 6) seguindo as recomendações do fabricante. Foram adicionados 2 µL do vetor contendo o fragmento de interesse em 40 µL de células competentes XL1 *Blue* e transferidos para uma cuveta de eletroporação previamente resfriada. A eletroporação foi conduzida em um eletroporador modelo 165-2107 (Bio-Rad) que foi ajustado com resistência de 25 µF, capacitância de 200 Ω, intensidade do pulso elétrico de 1,8 KV e a duração do pulso elétrico variou entre 4,0 e 4,5 ms. Ainda na cuveta, foi adicionado 1 mL de meio LB ao sistema de transformação, em seguida a cultura de células

transformadas foi transferida para um tubo estéril de 15 mL e submetida à agitação (220 rpm) por 1 h a 37<sup>0</sup>C. Após esse período, 50 a 150 µL da transformação foram plaqueados em 20 mL de meio LB sólido (meio LB líquido acrescido de 1,6% de ágar bacteriológico) pH 7,5 com ampicilina (100 µg/mL), X-Gal (20 µg/mL) e IPTG (0,16 mM). As placas foram incubadas a 37<sup>0</sup>C por aproximadamente 16 h e as colônias transformadas foram selecionadas verificando a ação da β-galactosidase que é codificada quando o gene LacZα presente no plasmídeo não é fragmentado pela entrada do inserto.



**Figura 6:** Mapa do vetor de clonagem dos produtos de 5' RACE PCR e PCR, pCR 2.1®. O vetor possui 3900pb, Promotores T7 e M13 flanqueando o sítio múltiplo de clonagem com o gene *lacZ*; o gene da  $\beta$ -galactamase ( $Amp^r$ ) que confere resistência à ampicilina e gene que confere resistência à canamicina. Origem de replicação e manutenção em *E. coli* (*f1ori*) e origem que permite a recuperação da fita senso para metagênese e fita simples para sequenciamento (*pUC ori*) . Vetor adquirido na forma linear e possui na extremidade 3' um resíduo de timina (T) que propicia a clonagem de produtos de PCR contendo resíduos de adenina nas extremidades (Invitrogen®)

### 3.5. Extração de DNA plasmidial (lise alcalina) em pequena escala

A extração de DNA plasmidial foi realizada segundo Maranhão e Morais (2003), com algumas modificações. Para a extração de DNA plasmidial, pelo menos quatro colônias transformadas foram coletadas separadamente e depositadas em tubos estéreis contendo 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 µg/mL. As culturas foram crescidas a 37<sup>o</sup>C sob força rotacional de 220 rpm durante aproximadamente 14 h. Em seguida, a cultura de bactérias (3 mL) foi centrifugada a 13000 rpm por 1 min. O sedimentado foi re-suspendido em 100 µL de solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; glicose 50 mM) adicionada de 2 µL de *RNase A* (10 mg/mL). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL da solução II (NaOH 0,2 M; dodecil sulfato de sódio - SDS 1%; p/v). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas no gelo por 5 min. Após adição de 150 µL da solução III (KOAc 3 M pH 5,0), as amostras foram agitadas em agitador de tubos tipo vortex rapidamente e incubadas no gelo por 5 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 min e a fase aquosa contendo o DNA plasmidial, precipitada com 2,5 v de álcool etílico 100%. Após um período de incubação de 20 min à temperatura ambiente, o DNA foi lavado com 800 µL de álcool etílico 70%, centrifugado a 1300 rpm por 5 min, seco à temperatura ambiente, eluído em 30 µL de água bidestilada estéril e finalmente, estocado a - 20<sup>o</sup>C.

### **3.6. Análise do perfil de restrição dos produtos da extração de DNA plasmidial**

As reações de restrição foram realizadas com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Gibco BRL) e seu respectivo tampão, React 3 (Gibco BRL), de acordo com as instruções do fabricante. Rotineiramente foram utilizadas 10 unidades de enzima para cada 1 µg de DNA, num volume final de 20 µL. As reações foram incubadas a 37<sup>0</sup>C em banho-maria por 2 a 4 h.

### **3.7. Seqüenciamento de DNA**

As amostras de DNA foram enviadas para seqüenciamento numa concentração variando entre 250 e 400 ng/µL num volume final de 4 µL. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando 4 µL de molde, 2 µL (3,2 pmoles) de cada iniciador (M13F ou M13R) e 2 µL de mistura fornecida pelo *Big Dye 3.1Kit* (Applied Biosystems). O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems) pela equipe da plataforma genômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### **3.8. Análise das seqüências**

A qualidade dos cromatogramas gerados no seqüenciador ABI3700 foi analisada utilizando o programa PHRED (Ewing et al., 1998). O programa CROSSMATCH foi usado para remover a seqüência do vetor PCR<sup>®</sup> 2.1 e dos adaptadores do Kit 5'RACE (Clontech). Para o agrupamento de seqüências semelhantes (clusterização), utilizou-se o programa PHRAP ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)). Esse programa forma um *contig*, que é uma seqüência consenso, derivada da junção de duas ou mais seqüências relacionadas, por múltiplos alinhamentos.

O programa CONSED (Gordon et al., 1998) foi utilizado para gerar a visualização do *contig* criado pelo PHRAP.

### **3.9. Northern blot**

RNA total de ovários, folha, antera e raiz de plantas de *B. brizantha*, foram extraídos pelo método de Trizol<sup>®</sup> *Reagent* como descrito anteriormente (item 3.4). Eletroforese em gel desnaturante foi realizada em gel de agarose 1,5% em tampão MOPS 1X (MOPS 10X = MOPS 0,2 M; Acetato de sódio triidratado 50 mM, Na<sub>2</sub>EDTA. 3H<sub>2</sub>O 10mM, pH 7,0). Para cada amostra foram aplicados 20 µg de RNA re-suspendido em 5 µL de água DEPC, 25 µL tampão de amostra para RNA (Azevedo et al., 2003) e desnaturado a 65°C por 20 min. Após 8 h de corrida a 40 V, o gel foi fotografado e o RNA transferido, por aproximadamente 15 h, por capilaridade para uma membrana de nylon *Hybond* N<sup>+</sup> (Amershan Biosciences). Em seguida, o RNA foi fixado à membrana por meio de luz ultravioleta – UV Stratalinker<sup>®</sup> 2400 (Stratagene) de acordo com o fabricante. A membrana foi incubada a 42°C por um período de 4 h em 10 mL de solução de pré-hibridização contendo SSPE 5X (20X SSPE = NaCl 3M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2 M; EDTA 0,02M, pH 7,4), Solução de Denhardt 2X, SDS 0,1%, DNA de esperma de salmão 20 µg/mL e água DEPC 0,1%.

As sondas marcadas radioativamente com [ $\alpha^{32}$  P] foram sintetizadas com o *Ready-To-Go DNA labelling beads Kit* (Amershan Biosciences). Este kit possui dNTPs, enzima, primer e tampão liofilizados. Para a síntese da sonda, 50 ng de DNA, inserto referente ao cDNA do clone 20 previamente clonado no vetor pGEM<sup>®</sup> – T Easy foram diluídas em 45 µL de água bidestilada e desnaturadas por 2 min a 95°C e imediatamente colocadas no gelo por 2 min. Após uma

breve centrifugação, o cDNA foi homogeneizado com as soluções liofilizadas do kit. Em seguida foram adicionados 5 µL de [ $\alpha^{32}$  P] dCTP. A mistura foi incubada a 37°C por 30 min. As sondas foram purificadas em *MicroSpin G50 columns* (Amershan Biosciences), desnaturadas por 2 min a 95°C, adicionadas à solução de pré-hibridização e incubadas a 42°C por 24 h para hibridização. A membrana foi lavada por três vezes por 3 a 5 min em 200 mL de SSPE 2X a 42°C. A membrana foi exposta a uma placa de *Phosphoimager* (FUGIFILM FLA-3000) e a análise da imagem gerada foi realizada a partir do *Imager Reader* FLA-3000 (FUGIFILM FLA-3000).

### **3.10. Polinização in vitro**

#### **3.10.1. Determinação da viabilidade polínica**

A viabilidade de polens de *B. decumbens* sexual e apomítica foi estimada pela análise de polens coletados de anteras maduras por dois métodos:

1- coloração do pólen: polens corados com DAPI 0,001 g/L (4'-6'-diamidino-2-phenylindole) em H<sub>2</sub>O pH 4,0 foram analisados sob UV que fluoresce a 360 nm. Polens corados com *Lissamine green* 1% foram analisados em microscopia de luz, campo claro. Os polens que apresentaram coloração azul ou verde foram considerados mortos. Além da coloração, também foram observados os aspectos morfológicos como tamanho, turgidez, forma e presença de núcleos.

2- crescimento de tubos polínicos in vivo: polinização foi feita na superfície do estigma. Após 4 h, 1 dia e 2 dias da polinização os pistilos foram coletados e colocados em solução fixadora de Carnoy (etanol: ácido acético, 3: 1 (v/v)) por 30 min, transferidos para etanol 70% por 1 h, enxaguados três vezes em H<sub>2</sub>O e

colocados em NaOH 8N por pelo menos 3 h. Em seguida, os espécimes foram corados com azul de anilina 1% em  $K_2HPO_4$  0,15M, colocados em uma gota de glicerina e examinados sob UV num comprimento de 360 nm. Dependendo do pH, os tubos emitem fluorescência de cor azul ou amarela.

### **3.10.2. Meio de cultura para germinação e crescimento de polens**

Os polens foram coletados das anteras de flores em pré-antese e de flores em antese. As anteras coletadas de flores em antese apresentavam-se deiscentes ou indeiscentes. As anteras que ainda não estavam abertas foram colocadas em placas de Petri sob luz incandescente até o momento da abertura. Os polens foram coletados e plaqueados em um meio basal contendo ácido bórico 0,03 g/L, nitrato de cálcio 0,03 g/L acrescido de Agar 0,19% de ou Phytigel 0,15%. Diferentes concentrações de sacarose ou açúcar de cana (0, 1, 5, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 33, 35 e 40%) foram testadas. A porcentagem de germinação e o crescimento dos tubos polínicos foram observados para vários acessos de *Brachiaria*. Cerca de 200 polens foram contados para cada acesso e fotografados sob microscópio estereoscópio Zeiss – Stemi SV11.

### **3.10.3. Maturidade da antera**

Para estabelecer a melhor condição de desenvolvimento de polens a ser utilizada no processo de polinização in vitro foram coletadas: anteras deiscentes e iniciando o processo de deiscência a partir de flores em antese e anteras indeiscentes de flores imediatamente antes da antese. As anteras foram depositadas em uma placa de Petri sob luz incandescente para deiscência. Em seguida, os polens foram coletados e transferidos para o meio

de germinação (sacarose 33%, ácido bórico 0,03g/L, cloreto de cálcio em H<sub>2</sub>O 0,03g/L, Agar 0,19%). A germinação e crescimento dos tubos polínicos foram observados sob microscopia de luz (microscópio estereoscópico Zeiss-SV11). Para cada estágio de desenvolvimento da antera foram feitas quatro repetições com cerca de 500 polens por placa.

#### **3.10.4. Desinfestação das inflorescências**

As inflorescências foram coletadas no campo e imediatamente colocadas em recipiente contendo água. No laboratório, os racemos foram separados e lavados por 2 min em álcool etílico 70%. Em seguida, foram transferidos para 40 mL de solução de hipoclorito de sódio 1,5% contendo uma gota de *Tween* 40. As inflorescências foram lavadas por três vezes em água estéril e transferidas para o meio de cultura basal (item 3.10.5) sem agar. Nesse meio, os explantes foram isolados e introduzidos no meio basal solidificado com 2,4 g/L de agar.

#### **3.10.5. Escolha do explante receptor do pólen**

Para determinar o melhor explante, foram observados aspectos como níveis de contaminação, receptividade ao pólen e viabilidade do explante após submissão ao meio de cultura. Nessa etapa, foram testados racemos inteiros, racemos cortados a cada duas e também a cada 3 espiguetas, pistilos isolados inteiros e isolados e cortados na base de maneira a expor o óvulo.

### **3.10.6. Estabelecimento de meio para manutenção de ovários polinizados**

Para o estabelecimento do meio de cultura para a manutenção dos ovários após a polinização foram utilizados 40 ovários, sendo 10 ovários por placa, para cada tratamento.

A composição do meio de cultura para manutenção dos ovários tem como base o meio para resgate de embriões de *Brachiaria* (Rodrigues-Otubo et al., 2000) com algumas modificações. O meio basal consiste de sais de MS suplementado com tiamina 1,0 mg/L, inositol 100 mg/L, sacarose 6 g/L e agar 2,4 g/L, pH 5,8. A partir do meio basal foram feitas três composições diferentes (tratamentos) como descrito a seguir:

Meio 1: meio basal adicionado de 0,2 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

Meio 2: meio basal adicionado de 0,2 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina).

Meio 3: meio basal adicionado de 0,2 mg/L de 2,4-D; 0,2 mg/L de BAP e de 0,25 mg/L de GA3 (ácido giberélico).

### **3.10.7. Polinização in vitro**

Dados preliminares indicaram que para polinização in vitro de *Brachiaria* é melhor utilizar pistilos seccionados na base e depositar os polens próximos à base seccionada. Este método evita barreiras de incompatibilidade ao longo do estilete e estigma e do tecido do ovário.

Inflorescências de *Brachiaria* contendo racemos com uma ou duas flores abertas foram coletadas um dia antes da polinização e colocadas em H<sub>2</sub>O.

Inflorescências de D4 e D58 contendo racemos com espiguetas prestes a entrar em antese foram coletadas, colocadas em um frasco com H<sub>2</sub>O e colocadas no escuro à temperatura ambiente durante aproximadamente 14h (durante a noite). Pistilos de flores recém abertas foram coletados com incisão na parte basal, e colocadas no meio de germinação de pólen, 10 pistilos por placa. As anteras foram coletadas e colocadas em placa de Petri estéril sob luz incandescente para abrirem. Anteras com uma pequena área de abertura nas extremidades foram manuseadas com uma pinça e o pólen foi espalhado diretamente da antera próximo à base seccionada do pistilo. As placas de Petri foram colocadas no escuro à temperatura ambiente por no mínimo 24 horas. Para confirmar a ocorrência da polinização, após 4, 24 e 48 h os ovários foram fixados em solução de Carnoy por 30 min. Alguns ovários foram transferidos para etanol 70% por 1 h, lavados por três vezes em H<sub>2</sub>O e colocados em NaOH 8N por pelo menos 3 h. Em seguida, os ovários foram colocados em azul de anilina 1% em K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,15M, depositados em uma lâmina com uma gota de glicerina e observados sob luz UV 360nm. Outros ovários foram fixados em FAA (fomaldeído 37%, ácido acético glacial, etanol 70%; 1: 1: 18 (v/v)), desidratados à temperatura ambiente em série crescente de etanol (70, 80 e 95%) por 1 h e transferidos para etanol 95% adicionado de solução de inclusão (JB-4 *Embedding Kit*, Polyscience) 1:1 (v: v) à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram depositadas em solução de inclusão pura por aproximadamente 18 h. Este processo foi realizado a 4°C. A solução de inclusão foi trocada e o sistema foi colocado sob vácuo por mais 2 h a temperatura ambiente. As amostras foram devidamente posicionadas em uma cápsula plástica a 4°C e colocadas numa estufa a 60°C para polimerização.

Após serem seccionadas (5  $\mu\text{m}$ ), as amostras foram coradas com solução aquosa de azul astra e safranina (0,9 e 0,1% (v/v) respectivamente). O excesso do corante foi removido com etanol 70%. As lâminas foram montadas com Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific) e analisadas sob microscópio de luz (Zeiss-Axiophot).

## 4. Resultados

### 4.1. Descrição do desenvolvimento do óvulo de *B. brizantha*

Para auxiliar as análises dos resultados de hibridização in situ, foi desenhado um esquema representativo do desenvolvimento do óvulo de *B. brizantha* (Figura 7). Nas plantas de reprodução sexual, a célula-mãe do megásporo (MMC) entra em meiose para formar quatro megásporos reduzidos, e posicionados linearmente no sentido micrópila-calaza. Desses, três degeneram e o calazal sobrevive e forma o megásporo funcional (FM). Após três mitoses sucessivas, ocorre o processo de celularização que culmina em um saco embrionário do tipo Polygonum. Durante a maturação, os dois núcleos polares se fundem originando um núcleo diplóide. Como ocorre em outras gramíneas, as antípodas proliferam para um total de 6 a 9 células. O processo da fertilização dupla resulta em um embrião diplóide e um endosperma triplóide. Nas plantas de reprodução apomítica, o desenvolvimento do saco embrionário se inicia de forma similar ao da planta sexual; uma MMC sofre meiose e forma quatro megásporos. Porém, nas plantas apomíticas, não três, mas todos os megásporos degeneram, e ao mesmo tempo algumas células do nucelo, as iniciais apospóricas (AI), crescem e por meio de duas mitoses consecutivas formam um coenócito (CO) composto de quatro núcleos posicionados no mesmo pólo. Após celularização, sacos embrionários não-reduzidos do tipo Panicum, contendo quatro células, são formados. A ausência de antípodas e a natureza não-reduzida das células são características desse tipo de saco embrionário. Mais de uma inicial apospórica pode se desenvolver concomitantemente, e dessa maneira, mais de um saco embrionário do tipo Panicum é encontrado. Enquanto os embriões se desenvolvem de forma

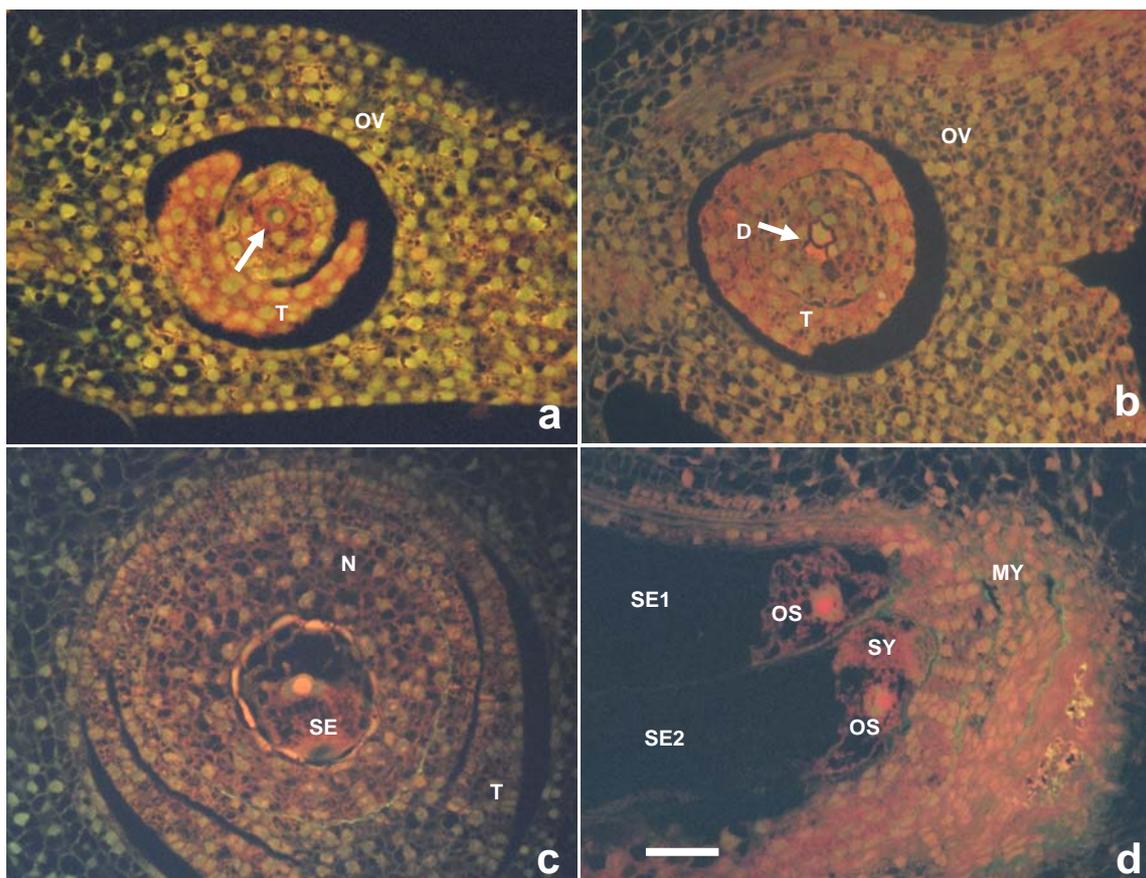
autônoma, em alguns casos antes da polinização, a fertilização da célula central é necessária para a formação do endosperma (Alves et al. 2001). O megásporo calazal pode sobreviver e formar um saco embrionário do tipo Polygonum. Nesse caso, um saco embrionário do tipo Polygonum pode ser encontrado em ovários de plantas apomíticas concomitantemente com aqueles de tipo Panicum. Em *B. brizantha* cv. Marandu, um saco embrionário do tipo Polygonum é encontrado em apenas 2% dos óvulos (Valle, 1986; Araujo et al., 2000).



#### **4.2. Avaliação da integridade do RNA total de secções de ovários a serem submetidos à hibridização in situ**

Todas as secções de ovários usadas nos experimentos de hibridização in situ passaram por teste de coloração com laranja de acridina para verificar a integridade do RNA. Após coloração, o RNA apresenta fluorescência laranja, enquanto o DNA manifesta fluorescência verde sob luz ultravioleta. No caso de degradação do RNA no tecido, visualiza-se uma fluorescência verde intenso e o laranja não é detectado. A integridade do RNA foi usada como condição para a realização dos experimentos de hibridização. Ovários de *B. brizantha* em diferentes estágios de desenvolvimento, mostrando RNA de qualidade adequada aos experimentos podem ser visualizados na Figura 8. As hibridizações in situ com as diferentes sondas foram realizadas separadamente, mas obedecendo às mesmas condições biológicas e experimentais: condições de cultura; coleta; tratamento das amostras e metodologia de hibridização.

A detecção da sonda marcada com digoxigenina foi realizada após exposição das secções ao NBT/BCIP, pela formação de precipitado de coloração azul/púrpura. Secções foram hibridizadas com a sonda senso de todos os clones para verificar o nível de hibridização inespecífica (*background*) e estabelecer parâmetros de comparação. Estas secções foram usadas como controle negativo. As considerações sobre presença ou ausência dos transcritos nos experimentos de hibridização foram feitas considerando o limite de detecção da técnica.

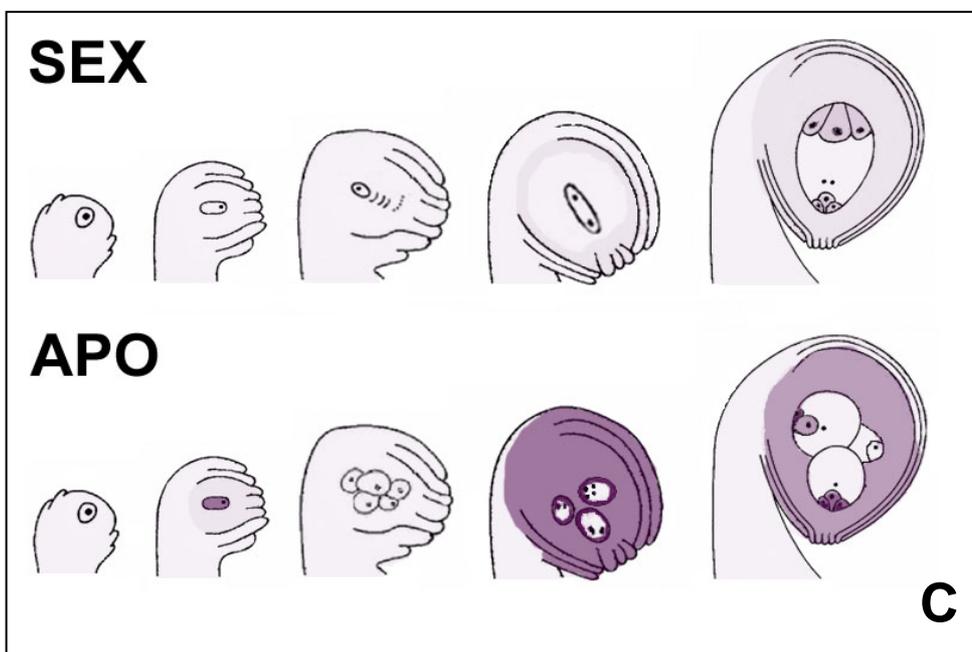
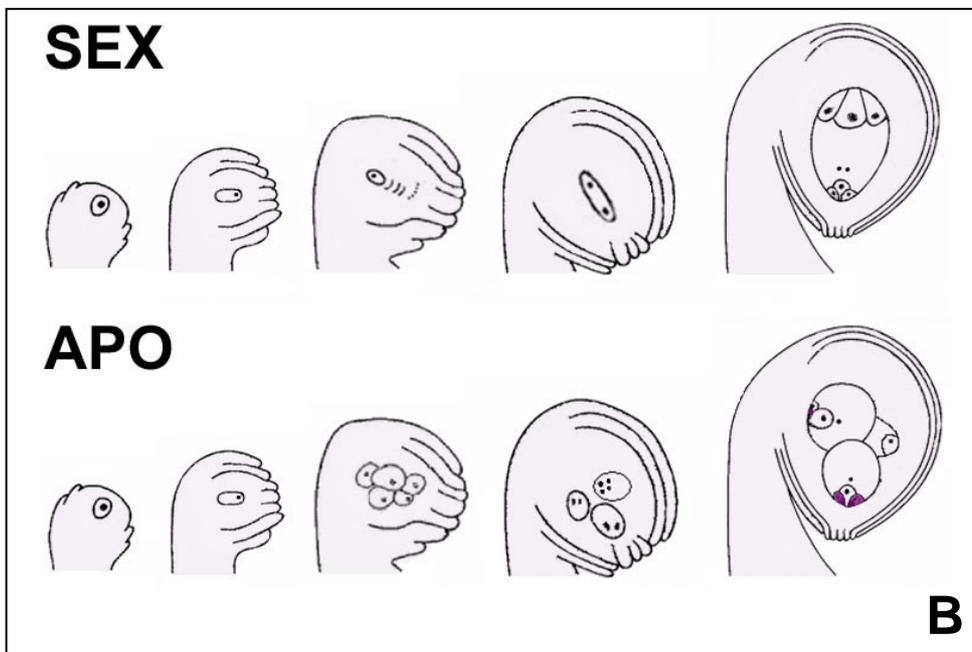
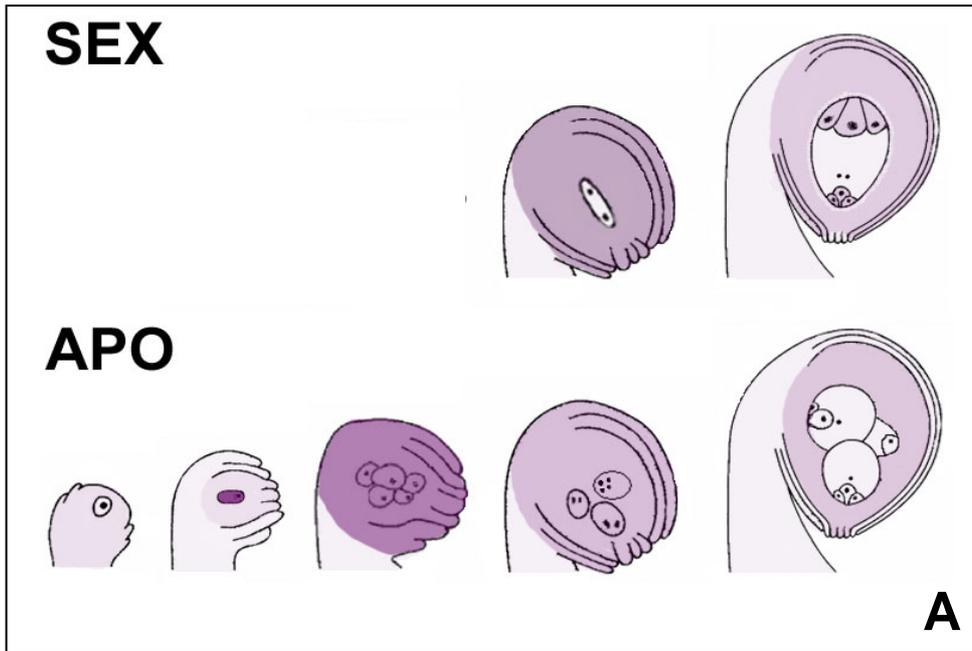


**Figura 8:** Secções histológicas de ovários de *Brachiaria brizantha*, acesso apomítico, coradas com laranja de acridina. **a-** ovário em megasporogênese contendo célula-mãe do megásporo (seta) envolvida pelo tecido nucelar do óvulo; barra=5,7  $\mu\text{m}$ . **b-** ovário em megasporogênese com díades de megásporo circundado pelo tecido nucelar; barra= 8,5  $\mu\text{m}$ . **c-** ovário em megagametogênese contendo saco embrionário no início da celularização envolvido pelo tecido nucelar; barra= 21,4  $\mu\text{m}$ . **d-** ovário contendo dois sacos embrionários (1 e 2) maduros. Na porção micropilar do óvulo visualiza-se a oosfera no saco embrionário 1, e a oosfera e uma das sinérgides no SE2; barra=9,2  $\mu\text{m}$ .

D=Díade de megásporo; OS= oosfera; OV=ovário; MY=porção micropilar; SE=saco embrionário; SY=sinérgides; N=tecido nucelar; T=tegumentos.

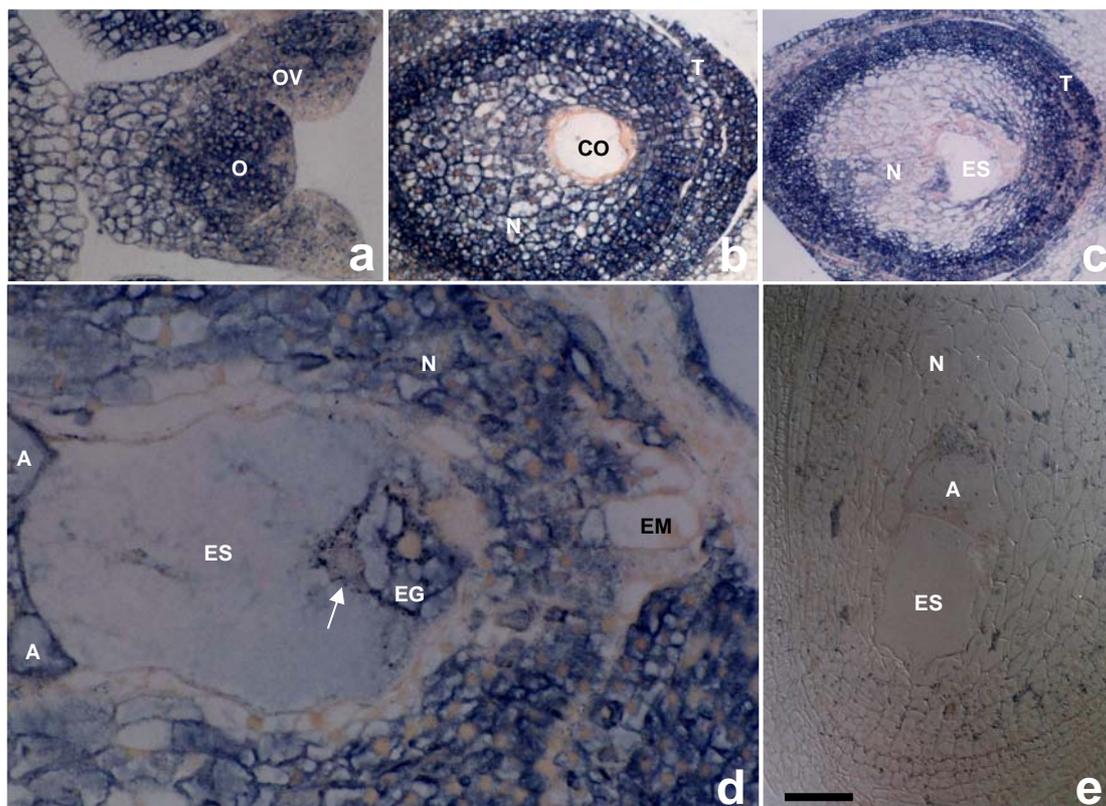
### **4.3. Localização dos transcritos dos clones 07, 10 e 29.**

Os resultados da hibridização in situ dos clones 07, 10 e 29 em *B. brizantha* sexual e apomítica estão esquematizados na figura 9A, B e C, respectivamente. Este esquema foi construído baseado na localização dos transcritos nos óvulos. Os resultados de cada clone estão relatados em detalhe nas figuras 10, 11, 12 e 13.



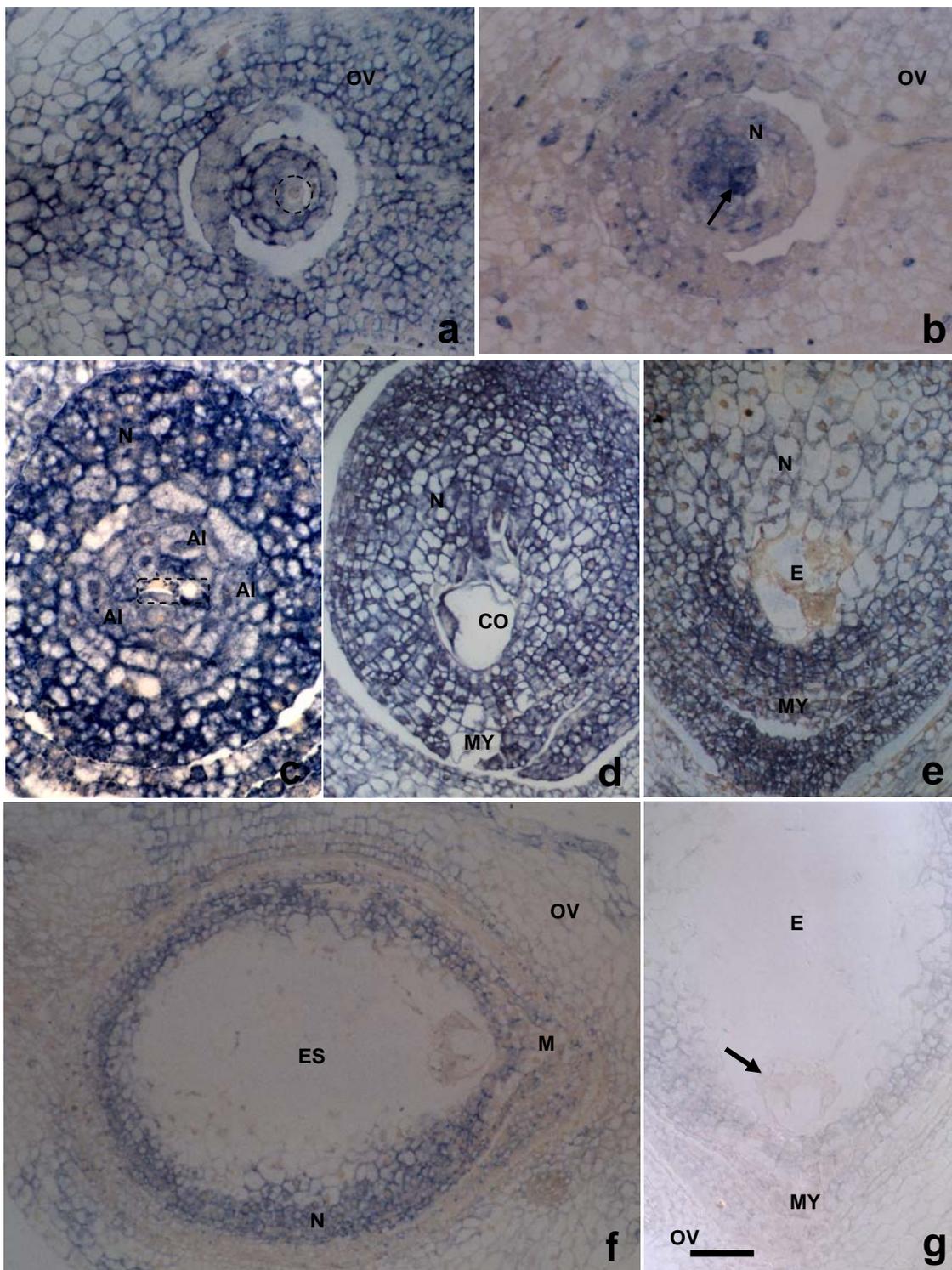
Nas figuras 10 e 11 são apresentadas secções de ovários incubadas com a sonda 07 em *B. brizantha* sexual e apomítica, respectivamente. Na hibridização da sonda anti-senso foi visualizado precipitado de coloração azul resultante da hibridização em todos os estágios de desenvolvimento tanto de plantas sexuais como de apomíticas. Os controles, secções hibridizadas com a sonda 07 senso não apresentaram precipitado de cor azul (Figura 10e; 11g). Nas plantas sexuais, a coloração foi detectada com a mesma intensidade no ovário e no receptáculo floral em estágio de desenvolvimento bem precoce, anterior a megasporogênese (Figura 10a). Em estágios posteriores de desenvolvimento, uma marcação discreta foi detectada em todo o ovário, porém muito mais acentuada nos óvulos. Nenhum sinal de hibridização foi detectado no coenócito (10b) ou saco embrionário jovem (Figura 10c). A presença do transcrito foi observada em todas as células do saco embrionário maduro e também nas células do nucelo e tegumentos, exceto nas células do *embellum* (Figura 10d). Nas plantas apomíticas (Figura 11), o transcrito do clone 07 foi detectado no ovário, e no nucelo do óvulo em estágio de célula-mãe do megásporo (Figura 11a). Seguindo o desenvolvimento, uma forte marcação foi detectada no meiócito enquanto nas células nucelares o sinal de hibridização foi detectado em menor intensidade e na parede do ovário nenhum sinal de hibridização foi observado além da coloração de fundo (Figura 11b). Nos óvulos contendo tétrades e iniciais apospóricas concomitantemente, o transcrito foi detectado no nucelo e nas iniciais apospóricas, mas ausente nas tétrades de megásporos (Figura 11c). O transcrito foi detectado no coenócito, no nucelo e também nos tegumentos dos ovários no estágio cenocítico (Figura 11d), mas estava ausente nas células de sacos embrionários jovens (Figura 11e) e maduros

(Figura 11f). Nestes sacos embrionários, sinal de hibridização foi detectado nas células do nucelo e tegumentos.

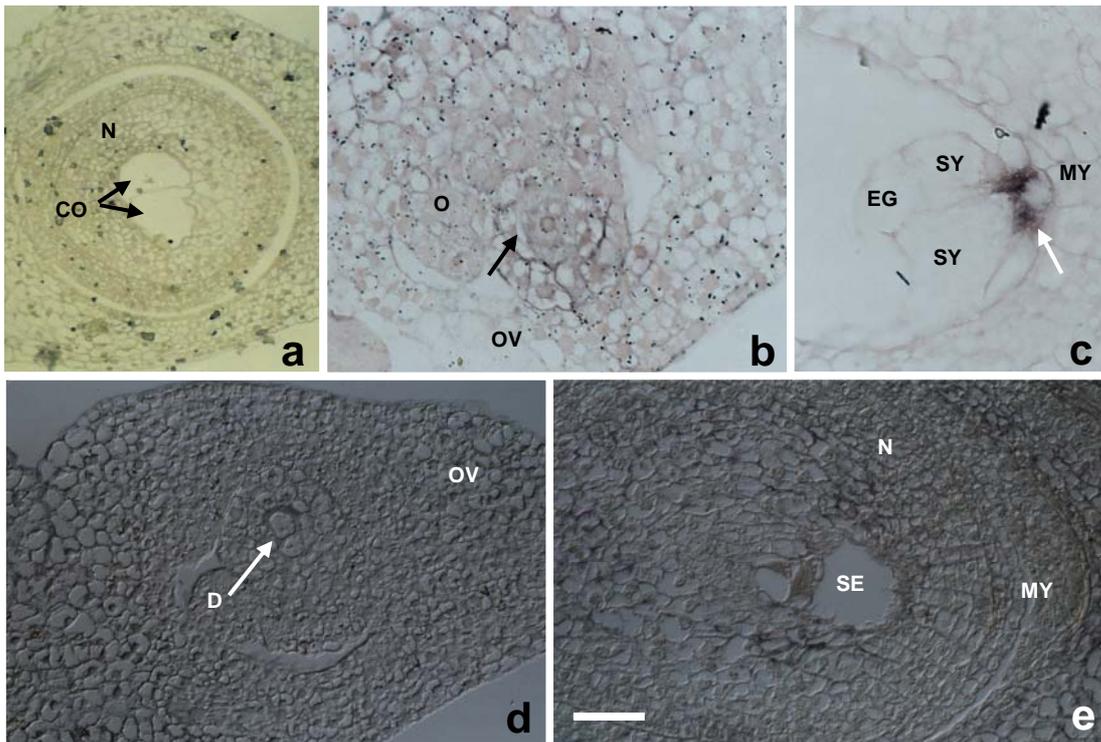


**Figura 10:** Expressão do clone 07 durante o desenvolvimento de ovários de *Brachiaria brizantha* sexual. **a-** o transcrito foi detectado no ovário e no óvulo num estágio precoce do desenvolvimento; barra=13,1  $\mu\text{m}$ . **b-** óvulo com tegumentos e nucelo fortemente marcados enquanto no coenócito a presença do transcrito não foi detectada; barra=12,4  $\mu\text{m}$ . **c-** ovário contendo óvulo com marcação mais intensa nas células do nucelo próxima aos tegumentos, e também nestes. O saco embrionário no início da celularização não apresenta marcação; barra=26,7  $\mu\text{m}$ . **d-** saco embrionário maduro com marcação na oosfera; célula central, principalmente em torno do núcleo polar e nas antípodas. As células do nucelo e tegumentos também apresentaram sinal de hibridização, porém, nas células do umbelo, assim como na camada de célula do nucelo próxima ao saco embrionário (cabeça de seta), a presença do transcrito não foi detectada; barra=3,4  $\mu\text{m}$ . **e-** hibridização, com a sonda senso, em ovário com saco embrionário maduro. Como esperado; nenhuma marcação foi detectada além da coloração de fundo; barra=14,3  $\mu\text{m}$ .

A=antípodas; CC=célula central; CO=coenócito; EG=oosfera; OV=ovário; O=óvulo; MY=porção micropilar; ES=saco embrionário; SY=sinérgides; N=nucelo; NP=núcleo polar; T=tegumentos; EM= embellum.

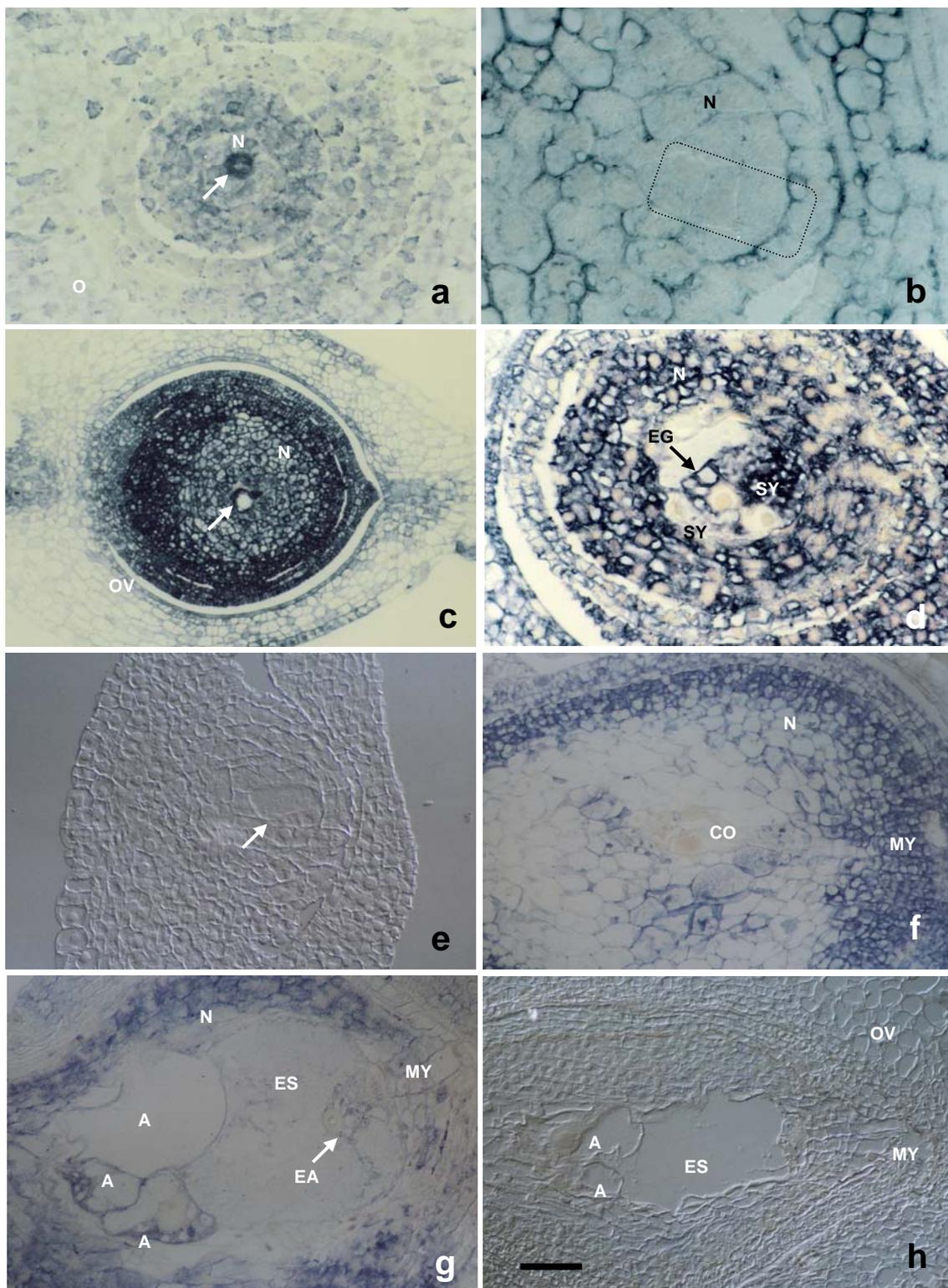


Os resultados da hibridização *in situ*, com a sonda sintetizada a partir do clone 10 estão apresentados na Figura 12. Os controles, hibridizações com a sonda senso, em ovários tanto de plantas sexuais quanto de plantas apomíticas, não apresentaram marcação, como esperado (Figura 12a). Nas hibridizações com a sonda anti-senso do clone 10 em ovários apomíticos, o transcrito foi detectado discretamente no nucelo dos óvulos contendo célula-mãe do megásporo (Figura 12b) e coenócito. Nos ovários contendo sacos embrionários celularizados o transcrito não foi detectado nas células do nucelo ou do saco embrionário, exceto na base das sinérgides de sacos embrionários maduros, onde um forte sinal de hibridização foi detectado (Figura 12c). Na região do aparato filiforme a marcação não foi detectada. O mesmo padrão de hibridização foi observado nos sacos embrionários maduros, ou seja, prontos para serem fertilizados. Sob as condições experimentais estabelecidas nesses experimentos, nas hibridizações realizadas com a sonda 10 anti-senso, em ovários de plantas sexuais nenhum sinal foi detectado, durante a megasporogênese (Figura 12d) ou megagametogênese (Figura 12e).



**Figura 12:** Secções semi-finas de ovários de plantas apomítica (**a-c**) e sexual (**d, e**) de *Brachiaria brizantha* hibridizadas com a sonda clone 10 senso (**a**) e anti-senso (**b-e**). **a-** ovário contendo dois coenócitos (CO) circundados pelo nucelo (N); barra= 17,3  $\mu\text{m}$ . **b-** fraco sinal de hibridização pode ser observado no ovário (OV) em megasporogênese, e também no óvulo (O) compreendendo a célula-mãe do megásporo (seta); barra= 6,3  $\mu\text{m}$ . **c-** ovário com saco embrionário (SE) maduro. Na porção micropilar (MY) do óvulo podem ser visualizadas duas sinérgides (SY) e a oosfera (EG). O sinal de hibridização foi detectado estritamente na base (seta) das sinérgides; barra= 7,4  $\mu\text{m}$ . **d-** sinal de hibridização não foi detectado em ovário (OV) contendo díade de megásporo (D); barra= 10  $\mu\text{m}$ . **e-** a presença do transcrito não foi detectada em ovário contendo saco embrionário jovem (SE) circundado pelo nucelo (N); barra= 9,6  $\mu\text{m}$ .

A figura 13 apresenta os resultados da hibridização in situ com transcritos do clone 29, em óvulos de *B. brizantha*. Nas reações de hibridização realizadas com a sonda 29 anti-senso em ovários de plantas apomíticas observou-se marcação tanto nos estágios de megasporogênese quanto de megagametogênese. Inicialmente, o transcrito foi detectado discretamente nas células do nucelo, enquanto um sinal de hibridização mais intenso foi detectado no meiócito (Figura 13a). Logo após a divisão do meiócito (Figura 13b), nas tétrades, nenhuma marcação foi detectada, enquanto nas células do nucelo foi visualizado sinal de hibridização. Posteriormente, na escala do desenvolvimento do óvulo, uma marcação forte foi detectada nos tegumentos, nucelo e coenócito (Figura 13c). Nenhuma marcação, além do sinal de fundo, foi detectada nas células do ovário. No saco embrionário maduro, o citoplasma das células do tecido nucelar continuou fortemente marcado, bem como o citoplasma da oosfera e das sinérgides (Figura 13d). Nos ovários de planta sexual, o transcrito do clone 29 não foi detectado durante a megasporogênese (Figura 13e). Nos sacos embrionários em estágio cenocítico a presença do transcrito não foi observada, mas nas células nucleares que os circundam o transcrito foi detectado (Figura 13f). Nos ovários contendo saco embrionário maduro o transcrito foi detectado no nucelo e também nas células do saco embrionário (Figura 13g). Nas hibridizações utilizadas como controle, sonda 29 senso, nenhum sinal de hibridização foi detectado (Figura 13h).



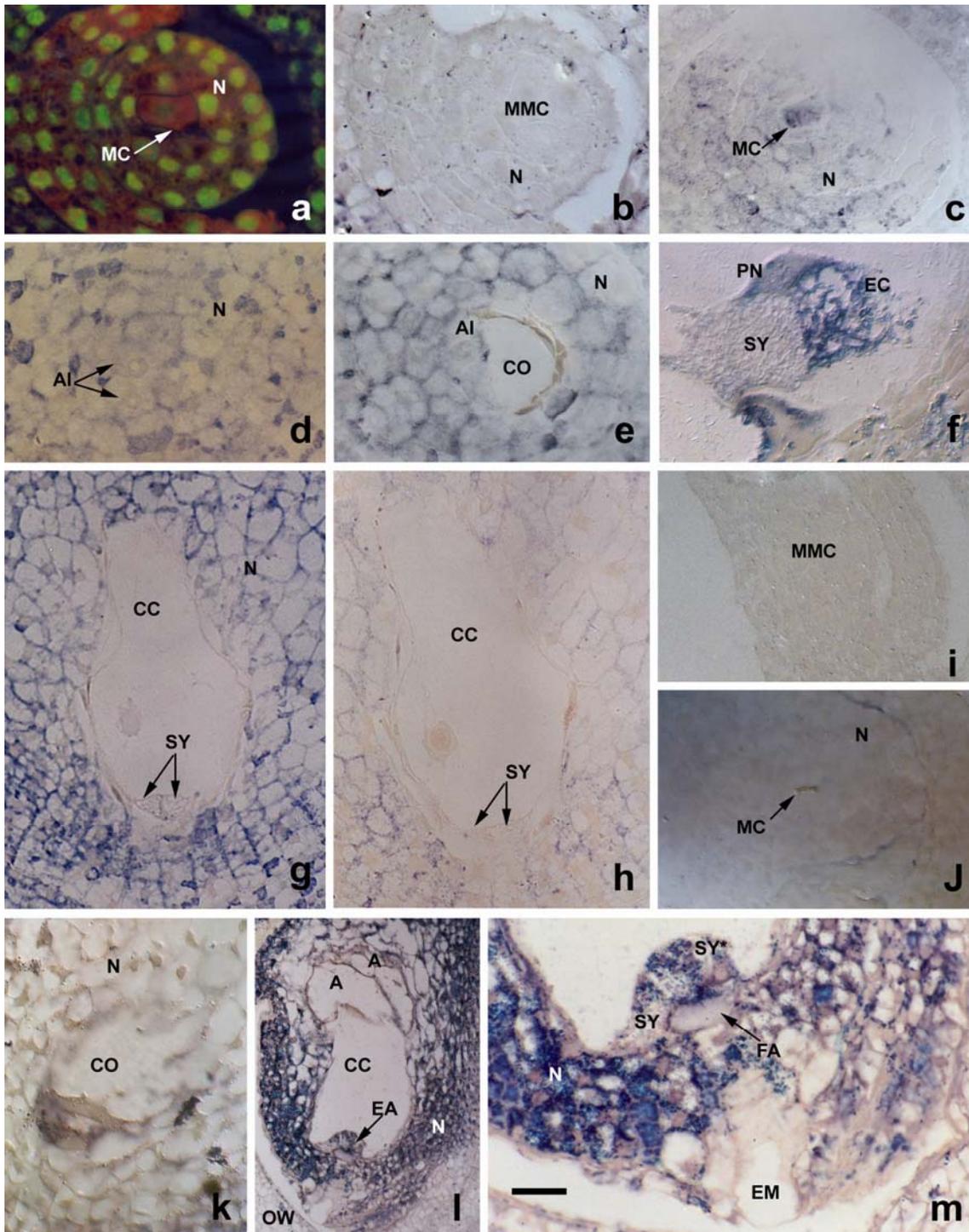
#### 4.4. Localização dos transcritos de *BbrizMYO*, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK*

Resultados da hibridização in situ de *BbrizMYO*, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK*, estão esquematizados nas figura 14 A, B e C respectivamente.



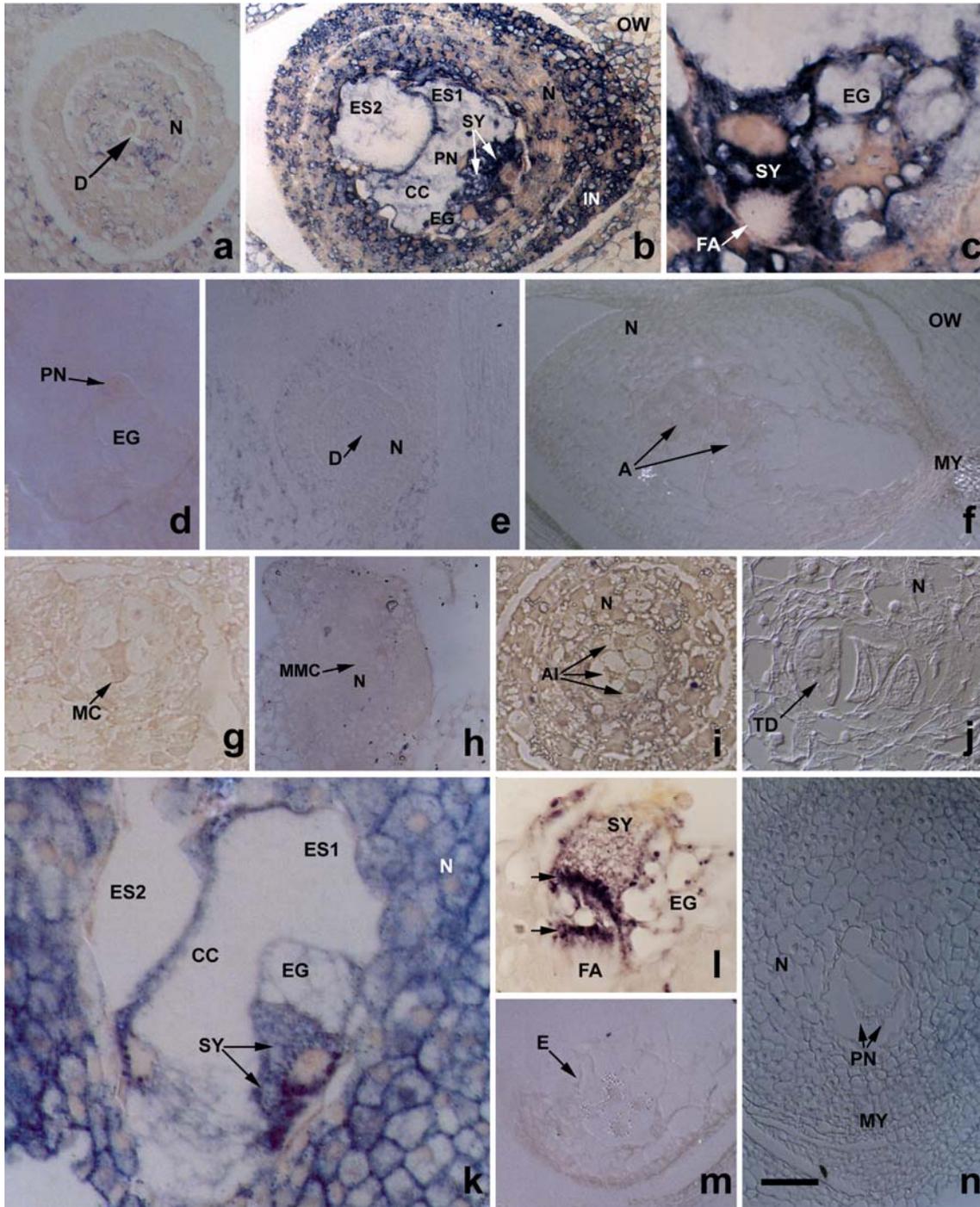
**Figura 14:** Representação esquemática da expressão de *BbrizMYO*, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK* durante o desenvolvimento de óvulos de plantas apomíticas. A coloração mais intensa indica o local de maior expressão. **A** - acréscimo de *BbrizMYO* foi observado no nucelo durante a maturação do óvulo. Nas células do saco embrionário houve uma modulação do transcrito durante o desenvolvimento do óvulo. A expressão foi particularmente observada no meiócito e sacos embrionários jovens, principalmente nas sinérgides e oosfera. **B** - o transcrito de *BbrizAQP* não foi detectado em óvulos contendo célula-mãe do megásporo, meiócito ou iniciais apospóricas. Nos óvulos contendo coenócito, o sinal foi detectado nos tegumentos. Nos sacos embrionários maduros a célula central apresentou marcação. O sinal mais intenso foi localizado nas células do aparato da oosfera. **C** - o transcrito de *BbrizMAPK* foi observado no nucelo de óvulos contendo coenócito e mais intensamente quando os óvulos continham sacos embrionários jovens. Um forte sinal de hibridização foi detectado nas sinérgides de sacos embrionários maduros. Nos sacos embrionários coletados na antese e 48 h após a antese, o transcrito não foi detectado, considerando o limite de detecção da técnica utilizada.

*BbrizMYO* em apomíticos não mostrou hibridização em óvulos contendo MMC (Figura 15b). Nas células do nucelo houve um acréscimo gradual do sinal sincronizado com o desenvolvimento progressivo do óvulo contendo meiócito até saco embrionário, mas não foi observado nenhum sinal nas células do *embellum* nos óvulos contendo coenócitos e sacos embrionários maduro. Sinal foi observado em meiócito (Figura 15c), mas foi muito fraco ou ausente nas iniciais apospóricas (Figura 15d). No coenócito, nenhum sinal foi observado, embora as células do nucelo tenham apresentado fraco sinal de hibridização (Figura 15e). Logo após a celularização, um forte sinal foi observado nas células do aparato da oosfera, na célula central e também nas células do nucelo. Seguindo o desenvolvimento, foi observado que, primeiro, uma das sinérgides (Figura 15f) e em seguida, no decorrer do desenvolvimento, todas as células do saco embrionário pararam de expressar *BbrizMYO* (Figura 15g). Durante o desenvolvimento sexual, o sinal de hibridização de *BbrizMYO* foi completamente ausente na célula-mãe do megásporo (Figura 15i), meiócito (Figura 15j) e estágio cenocítico (Figura 15k); entretanto, estava presente nas células do aparato da oosfera e nucelo de óvulos contendo saco embrionário maduro (Figura 15l; 15m) e ausente nas células do *embellum* ou célula central. Cortes hibridizados com a sonda senso, controle negativo, não apresentaram precipitado de cor azul (Figura 15h).



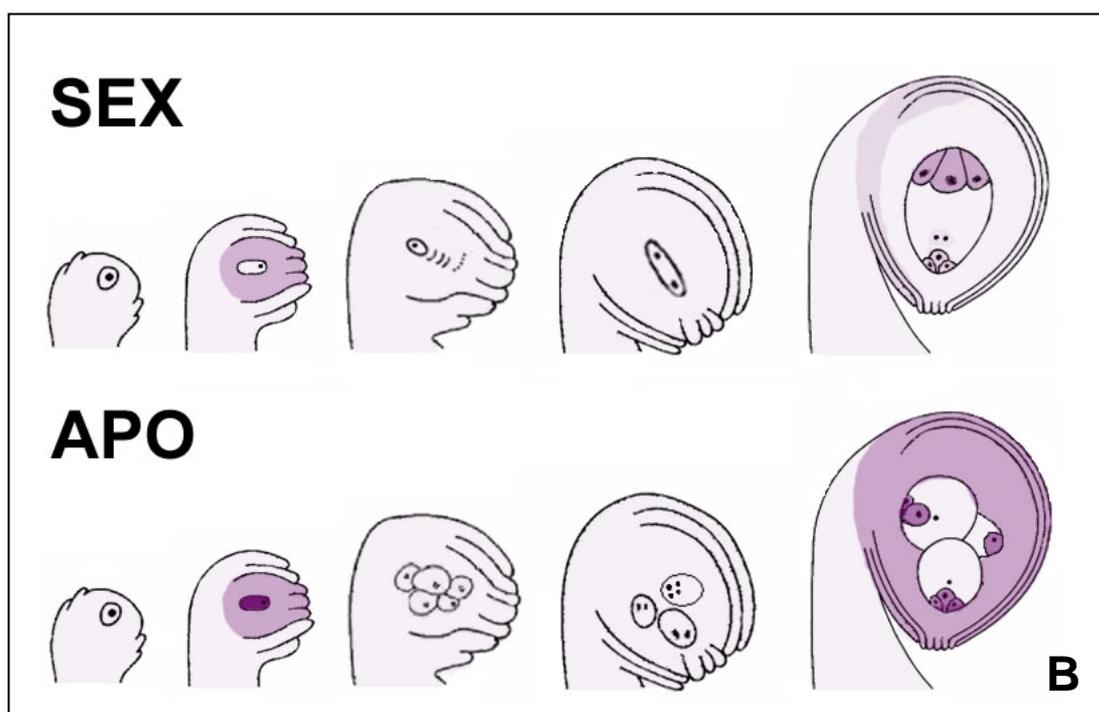
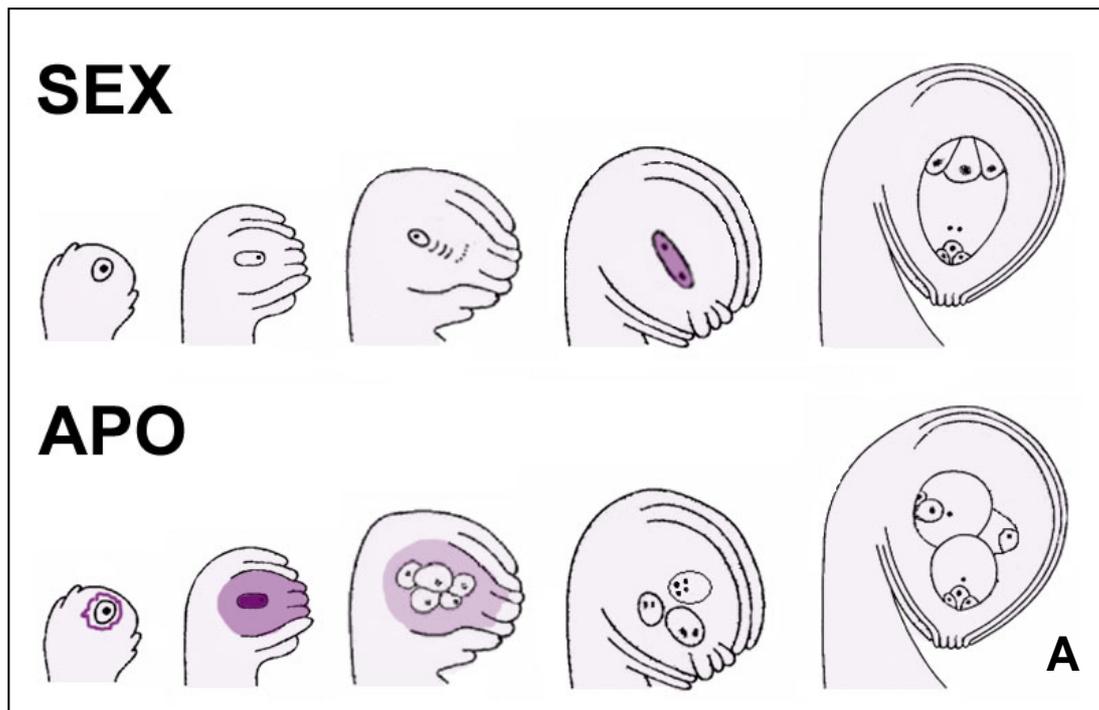
Nas plantas apomíticas, sinais de hibridização com a sonda *BbrizAQP* não foram detectados em célula-mãe do megásporo, meiócito (Figura 16a) e iniciais apospóricas. Nos óvulos com coenócito, sinal foi observado no nuclolo, mas não nas células da micrópila. A porção dos tegumentos próxima à micrópila também apresentou sinal que permaneceu no saco embrionário maduro. Nestes, as células do aparato da oosfera mostraram forte sinal de hibridização, e a célula central também apresentou marcação (Figura 16b e 16c). Nas plantas sexuais, transcritos de *BbrizAQP* não foram detectados em nenhum estágio de desenvolvimento como apresentado em díade (Figura 16e) e saco embrionário maduro (Figura 16f). A figura 16d mostra um corte hibridizado com a sonda senso onde não foi detectada a presença do transcrito, como esperado.

Nas plantas apomíticas a expressão de *BbrizMAPK* foi negativo em célula-mãe do megásporo, meiócito e iniciais apospóricas (Figura 16i). Sinal muito fraco pôde ser observado no citoplasma do coenócito e também no nuclolo. Os tegumentos não apresentaram sinais de hibridização exceto no pólo micropilar. Nos sacos embrionários jovens, todas as células do óvulo mostraram sinal de hibridização, incluindo o nuclolo (Figura 16k). Nos sacos embrionários maduros, apenas as sinérgides apresentaram marcação (Figura 16l). Durante a antese e 48 h após polinização, na presença de embrião, os transcritos não foram observados (Figura 16m). Analogamente, nenhum sinal de hibridização foi detectado em óvulos de plantas sexuais em nenhum estágio de desenvolvimento como célula-mãe do megásporo (Figura 16h); tétrades (Figura 16j) e saco embrionário maduro (Figura 16n). Secção hibridizada com a sonda senso, controle negativo, é mostrada na figura 16g.



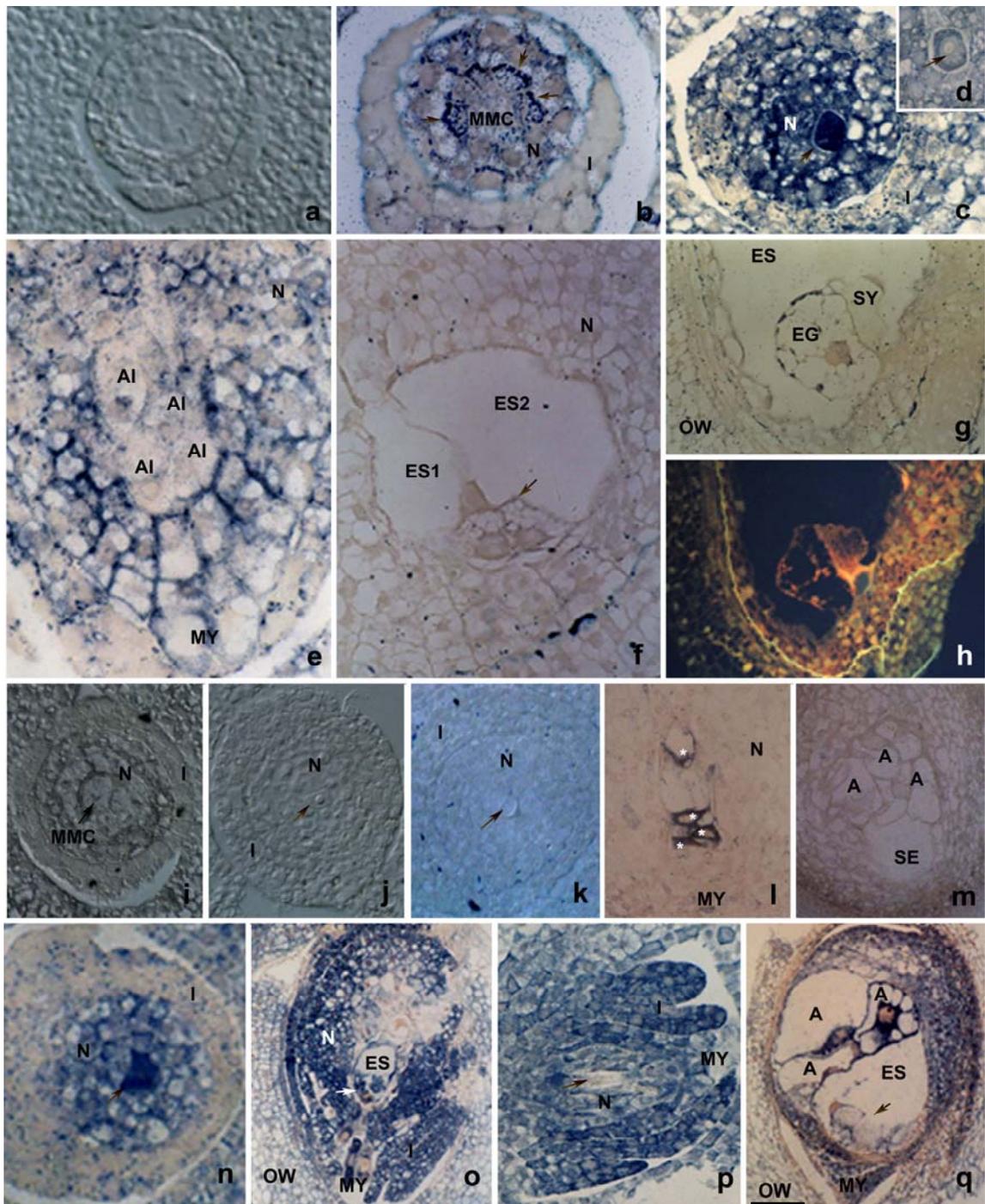
#### 4.5. Localização do transcrito de *BbrizREC* (clone 20) em *B. brizantha* e *B. decumbens*

Resultados da hibridização in situ de *BbrizREC* em *Brachiaria brizantha* sexual e apomítica estão esquematizados na Figura 17A e de *Brachiaria decumbens* sexual e apomítica na Figura 17B.



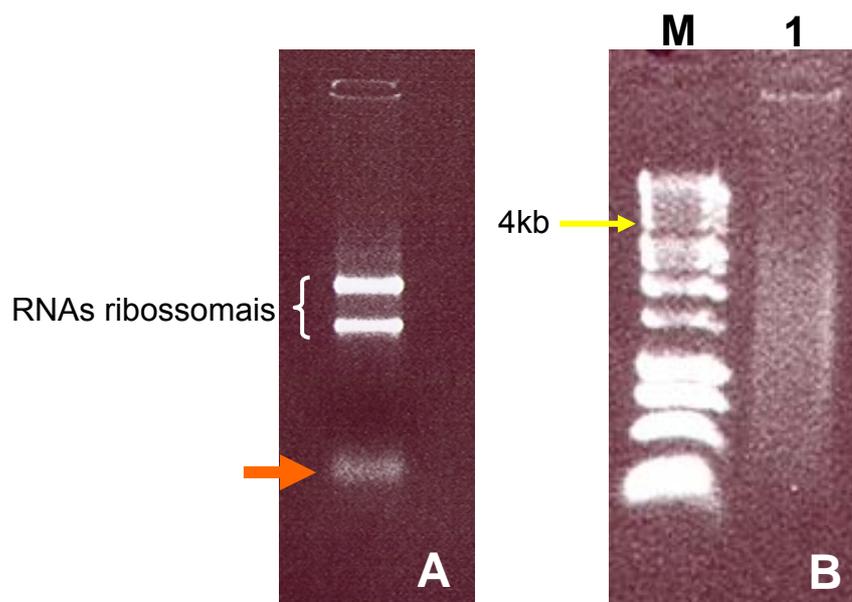
Os resultados de hibridização *in situ* nas duas espécies são apresentados na figura 18. A determinação do modelo de expressão de *BbrizREC* em *B. brizantha* e *B. decumbens*, mostrou que a expressão deste transcrito é confinada aos óvulos. Durante a megasporogênese, o sinal foi primeiro detectado no citoplasma de poucas células nucelares que circundam a célula-mãe do megásporo enquanto outras células do óvulo como nucelo e tegumentos não apresentaram sinal de hibridização (Figura 18b). Seguindo o desenvolvimento, quando o megásporo está presente no óvulo, o sinal de hibridização foi detectado no nucelo e também nos tegumentos. Um forte sinal foi detectado no citoplasma do megásporo (Figura 18c) embora a presença do transcrito não tenha sido detectada no núcleo (Figura 18d) do megásporo. Um sinal menos intenso foi observado. No final da megasporogênese, quando o megásporo já sofreu meiose e as iniciais apospóricas estão presentes, o sinal de hibridização foi detectado com menos intensidade nas células do nucelo, principalmente nas células mais próximas à micrópila, mas não no citoplasma das iniciais apospóricas (Figura 18e). Nenhum sinal de hibridização foi detectado durante a megagametogênese em óvulos contendo coenócitos, sacos embrionários jovens (Figura 18f), quando começa o processo de celularização, ou em sacos embrionários maduros (Figura 18g). Nos ovários de *B. brizantha*, acesso sexual, transcrito de *BbrizREC* não foi detectado em óvulos contendo célula-mãe do megásporo (Figura 18i), megásporo (Figura 18j), coenócitos (Figura 18k) ou sacos embrionários maduros (Figura 18m). Uma forte marcação foi detectada por um curto período nos sacos embrionários jovens (Figura 18l).

Nos óvulos de *B. decumbens*, acesso apomítico, similarmente a *B. brizantha*, um forte sinal foi detectado no citoplasma do megásporo, enquanto nas células nucelares a presença do transcrito foi detectada em menor quantidade (Figura 18n). Nos óvulos com sacos embrionários maduros, um forte sinal de hibridização foi observado nos tegumentos interno e externo, nucelo e nas células do aparato da oosfera (Figura 18o). O transcrito foi detectado em dois estágios de desenvolvimento de ovário de *B. decumbens*, acesso sexual. Primeiramente, durante a megasporogênese, quando sinal da expressão foi detectado nos tegumentos e no nucelo, mas estava ausente no meiócito (Figura 18p). Em seguida, no final da megagametogênese, quando o saco embrionário já estava diferenciado, Ao contrário das antípodas que apresentou um forte sinal de hibridização, uma marcação discreta foi observada nos tegumentos, no nucelo e também nas células do aparato da oosfera (Figura 18q).



#### 4.6. Verificação da qualidade dos RNAs e cDNAs

A pureza e qualidade do RNA extraído de ovários de *B. brizantha* foram verificadas por espectrofotometria e por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Figura 19A). Os cDNAs sintetizados por transcriptase reversa foram verificados em gel de agarose 1,2% (Figura 19B).

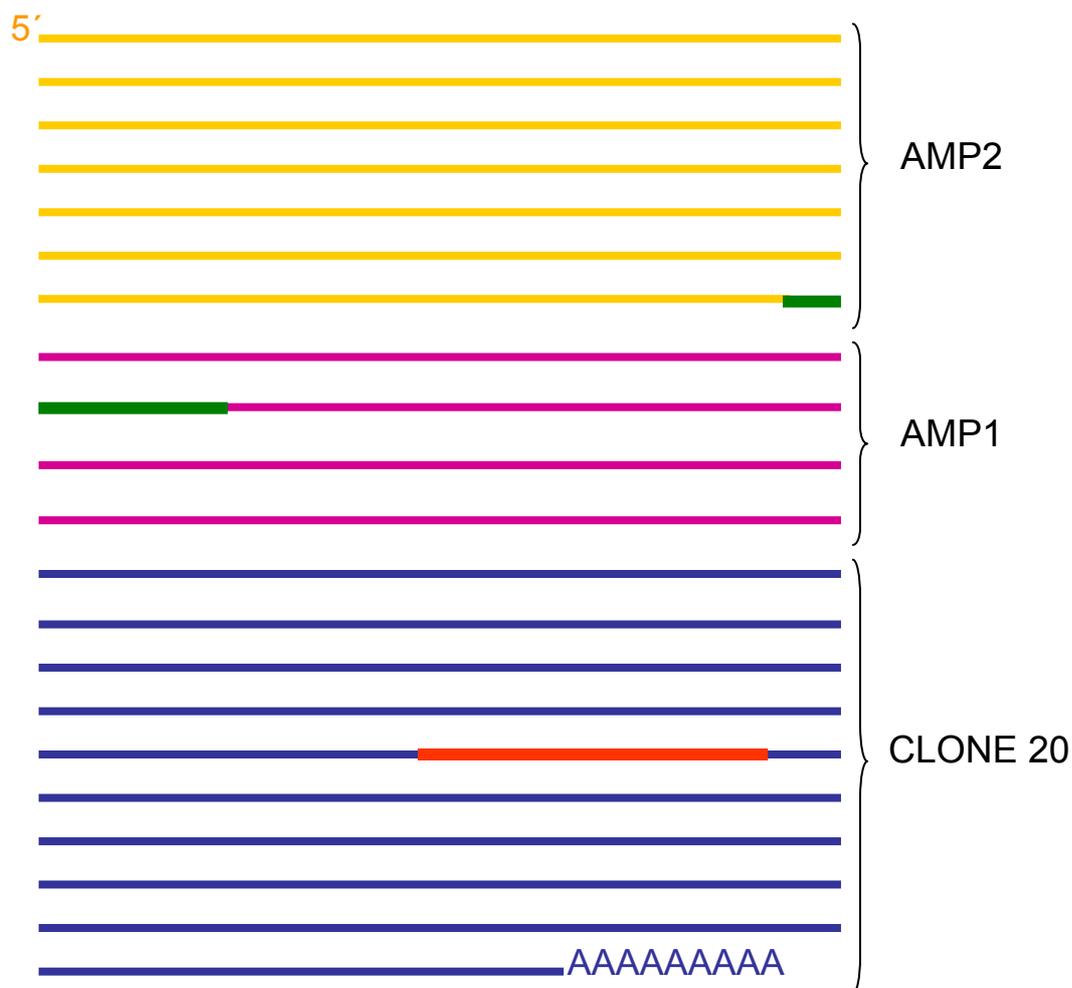


**Figura 19:** Análise de RNA total e cDNA de ovários, de *Brachiaria brizantha*, apomítica, em megasporogênese. **A** - visualização de 0,5 µg de RNA total em gel de agarose 1,2% RNAase free. Os fragmentos mais intensos correspondem aos RNAs ribossomais e pequenos RNAs (seta). **B** - coluna M: marcador de massa molecular (1kb ladder, Promega®) Coluna 1: visualização de 2 µL de cDNA sintetizado a partir de RNA poli-A+ em gel de agarose 1,2%.

#### 4.7. Amplificação de *BbrizREC* por 5' RACE

Os cDNAs ligados aos adaptadores complementares AP1 (Tabela 3) serviram como molde para amplificação da seqüência nucleotídica de *BbrizREC* nas reações de 5'RACE como esquematizado na figura 20. A amplificação a partir do clone 20 resultou em vários fragmentos. Estes foram purificados diluídos e utilizados como molde para uma nova amplificação com um iniciador mais interno, denominado Rev 75. Apenas um fragmento, o mais intenso, de 750pb

foi re-amplificado mostrando que apenas esse fragmento era específico do clone 20. Após seqüenciamento e análise dos cromatogramas gerados, verificou-se que a seqüência *BbrizREC* foi acrescida de 216 nucleotídeos. A partir desta, foram desenhados outros iniciadores e novos fragmentos gerados por 5'RACE, purificados e clonados. Após análise do perfil de restrição com *EcoRI*, enzima que libera o fragmento do vetor pCR 2.1, os fragmentos liberados foram seqüenciados e submetidos a novo seqüenciamento e análise. A análise da seqüência predita de aminoácidos em banco de dados atualizado revelou similaridade com outras seqüências que também não codificam para proteínas com função conhecida (Tabela 4) e mostrou que o transcrito de *BbrizREC* está incompleto no sentido 5'.



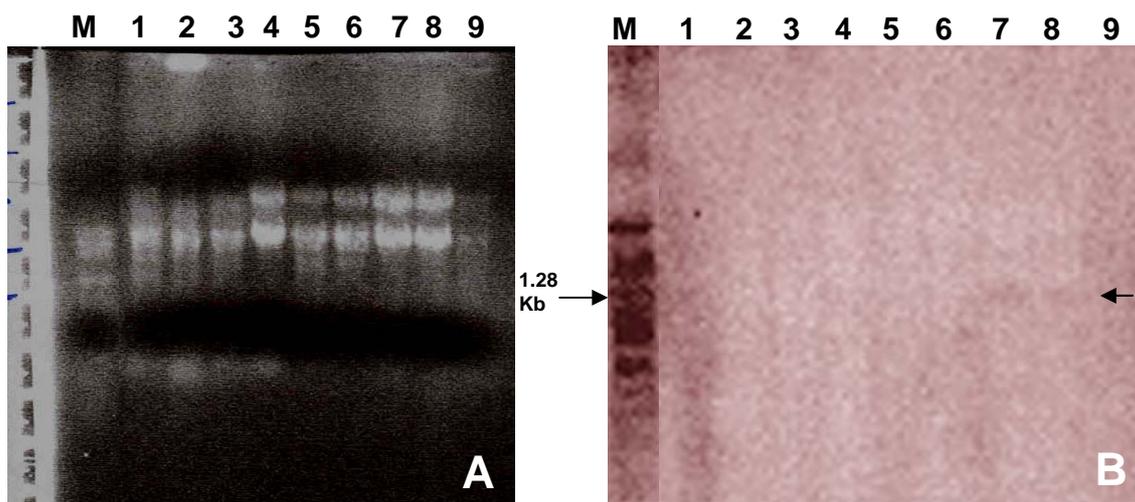
**Figura 20:** Esquema da seqüência nucleotídica de *BbrizREC*. **A-** seqüência primária de *BbrizREC* gerada por 5' RACE. A seqüência inicial (clone 20) utilizada para desenhar o iniciador usado na primeira amplificação de *BbrizREC* é mostrada em azul. a localização do iniciador usado para gerar AMP1 (seqüência resultante da primeira amplificação), em vermelho; seqüência resultante de AMP1, em rosa; a localização do iniciador usado para gerar a seqüência da segunda amplificação (AMP2), em verde e a seqüência gerada a partir da segunda amplificação (AMP2) é mostrada em laranja.

**Tabela 4:** Similaridade da seqüência deduzida de aminoácido de *BbrizREC* (1037 nucleotídeos) contra diferentes seqüências de proteínas do banco de dados não redundante pelo NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) Blast.cgi).

<b>Seqüências</b>	<b>E-value</b>
gi:125550656 ( <i>Oryza sativa</i> )	2e-130
gi:115461825 ( <i>Oryza sativa</i> )	2e-129
gi:125592648 ( <i>Oryza sativa</i> )	8e-129
gi:57863804 ( <i>Oryza sativa</i> )	1e-92
gi:54306076 ( <i>Oryza sativa</i> )	3e-92
gi:92888832 ( <i>Medicago truncatula</i> )	2e-79
gi:92880911 ( <i>Medicago truncatula</i> )	2e-79

#### 4.8. Detecção do transcrito *BbrizREC* por *northern blot*

Foi constatado por *northern blot* que a sonda de 498 pb relativa ao clone 20 marcado radioativamente hibridizou exclusivamente, em nossas condições experimentais, com RNA de aproximadamente 1,2 kb de raízes de plantas apomíticas e sexuais (Figura 21A; B).



**Figura 21:** Análise da expressão do transcrito do clone 20 em diferentes tecidos de plantas sexuais e apomíticas de *Brachiaria brizantha* por *northern blot*. **A-** RNA total (20µg) de ovários, folhas e raízes de *B. brizantha* apomítica (B30) e sexual (B105) e anteras de *B. brizantha* apomítica, separado por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,5% em condições *RNase free*. **B-** *northern blot* do gel apresentado na figura 21 A. O DNA do clone 20, de 498 pb, foi utilizado como sonda marcada radioativamente. A expressão do transcrito foi detectada apenas em raízes de B30 e de B105 (seta). Nos demais tecidos, a presença do transcrito não foi detectada nas condições experimentais utilizadas.

Coluna M: marcador de massa molecular (0.16-1.77Kb RNA *ladder*, Invitrogen); coluna 1: ovário B30 I/II; coluna 2: ovário de B30 III/IV; coluna 3: ovário de B105 I/II; coluna 4: ovário de B105 III/IV; coluna 5: folha de B30; coluna 6: folha de B105; coluna 7: raiz de B30; Coluna 8: raiz de B105; coluna 9: antera de B30.

## **4.9. Polinização in vitro**

### **4.9.1. Viabilidade do pólen**

A qualidade do pólen foi determinada para diferentes espécies de *Brachiaria*. O corante vital *lissamine green* permite a distinção entre polens viáveis e não viáveis. Além disso, a dimensão do pólen, presença de vacúolo no citoplasma, número de núcleos e presença de vestígios da parede celular com ou sem plasma pode dar uma idéia do desenvolvimento do pólen. Algumas características do desenvolvimento, como presença de vacúolos, servem como indicativo do crescimento e acúmulo de material de reserva do pólen. O desenvolvimento dos polens (D) é apresentado na tabela 5. Um elevado número destes polens teve desenvolvimento lento (S); os polens pequenos, usualmente com um único vacúolo e dois núcleos representam um estágio de desenvolvimento precoce do gametófito ou pólen jovem. Tais polens apresentam desenvolvimento retardado (R); a presença de polens com citoplasma degenerado sugere degeneração no começo do estágio de micrósporo (M). A presença de resíduos de parede celular indica degeneração do micrósporo (E), imediatamente antes da formação de tétrades livres.

A consideração mútua destas características pode dar uma indicação sobre a qualidade do pólen que é o principal ponto para se começar experimentos de polinização e fertilização in vitro.

**Tabela 5:** Classificação quanto ao desenvolvimento e viabilidade de polens presentes em anteras maduras de diferentes espécies de *Brachiaria*.

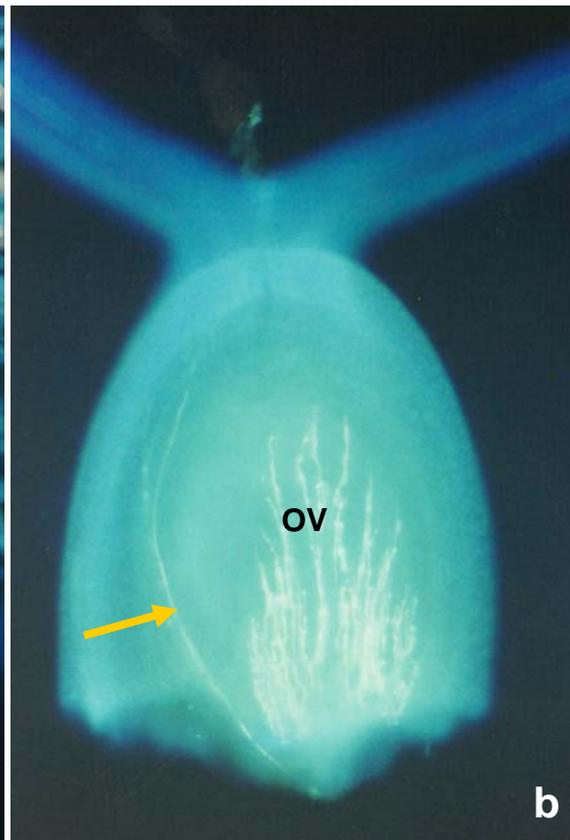
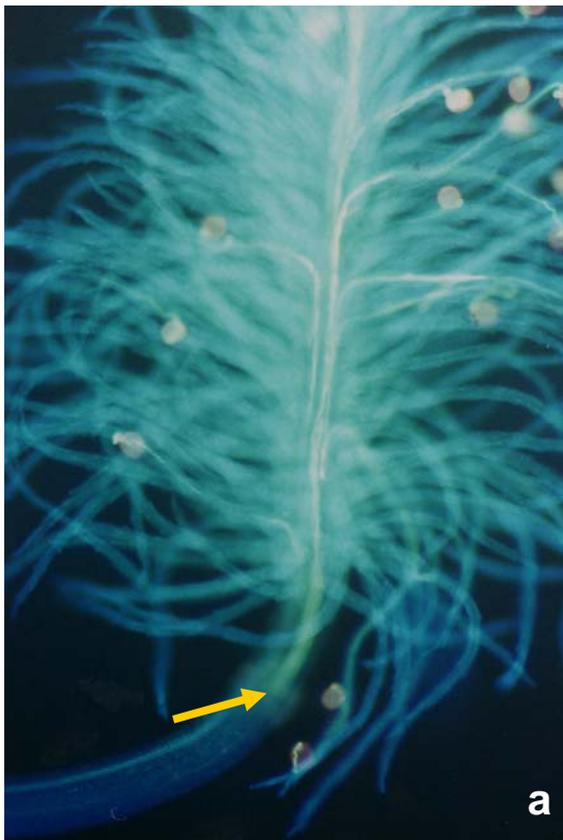
Acesso (Ploidia)	D	N	LP		VP		SP		PP I	WP
			V	I	V	I	-	I		
<i>B. ruzizensis</i> R50 (2N=2X)		258	76	1	8	0	5	5	4	1
<i>B. ruzizensis</i> R112 (2N=2X)	S,R	644	0	0	32	0	7	58	0	3
<i>B. ruzizensis</i> R44 (4N=4X)	M,E	388	39	0	0	0	22	0	17	22
<i>B. decumbens</i> D4 (2N=2X)		242	87	0	0	0	6	0	0	7
<i>B. decumbens</i> D62 (2N=4X)	R	386	18	2	21	1	34	18	0	6
<i>B. decumbens</i> D58 (2N=4X)	R,E	259	33	1	5	0	41	7	1	12
<i>B. brizantha</i> B112 (2N=4X)	S	273	47	3	22	1	10	2	4	1
<i>B. brizantha</i> B291 (2N=4X)	R,E	325	8	1	19	1	36	25	0	10
<i>B. humidicola</i> (2N=4X)	R,E	262	39	0	4	0	37	0	1	19

(A)=acesso; D=estágios de desenvolvimento: (S)=desenvolvimento lento; (R)=desenvolvimento retardado; (M)=estágio de micrósporo; (E)=pólen vazio; (N)= número total de polens contados; (LP)= percentagem de polens grandes, V =viáveis e I= inviáveis; (VP)= percentagem de polens com vacúolos V =viáveis e I= inviáveis; (SP)= percentagem de pólen pequeno – sem viabilidade determinada e I= inviáveis, (PP)= polens com plasma inviáveis (I) (WP)= polens com parede;

Nas condições experimentais sob as quais foram conduzidos estes experimentos, duas das plantas sexuais diplóides ( $2n=2x$ ), R50 e D4, apresentaram aproximadamente 85% de polens viáveis. Entre as plantas apomíticas tetraplóides ( $2n=4X$ ) a maioria apresentou viabilidade polínica em torno de 40%, exceto a B112, em torno de 69% e a B291 de 27%. Entre as plantas analisadas a maioria apresentou polens com desenvolvimento retardado e aborto precoce. Outras duas, a R112 e a B291 apresentaram polens com desenvolvimento lento.

A coloração de polens com DAPI confirmou que o pólen é tri-celular. Na maioria dos polens os núcleos das células germinativas foram claramente visualizados. Eles são pequenos e apresentam cromatina contraída. O núcleo da célula vegetativa é difuso, grande e apresenta cromatina menos contraída.

Após polinização in vivo na superfície do estigma o crescimento do tubo polínico foi observado por coloração com azul de anilina. A Figura 22a apresenta vários tubos em crescimento no estigma. O número de tubos polínicos é reduzido no estilete e apenas um deles atinge a micrópila (Figura 22b). A coloração por DAPI revelou que os núcleos espermáticos estão presentes nos tubos polínicos crescidos no meio de cultura. Estes tubos polínicos apresentam comprimento dez vezes maior em relação ao diâmetro.



#### 4.9.2. Meio de cultura

Concentrações crescentes de sacarose, de 10% a 40%, foram testadas em meio de cultura para germinação de pólen. Como mostrado na tabela 6, a germinação de polens *in vitro* é diferente nas diferentes espécies e concentrações de sacarose usadas. *B. decumbens* sexual diplóide (D4) e apomítica tetraplóide (D62, D58) e *B. brizantha* sexual diplóide (B105) apresentaram boa capacidade de germinação e crescimento de tubo polínico *in vitro*, nas condições testadas e *B. ruziziensis* sexual diplóide (R50 e R112) e tetraplóide (R44) têm baixa capacidade de germinação nas condições testadas. *B. humidicola* apresentou nível médio de germinação e crescimento de pólen. Na condição de 33% de sacarose ou em torno desta ocorreu a maior taxa de germinação e crescimento de tubos polínicos.

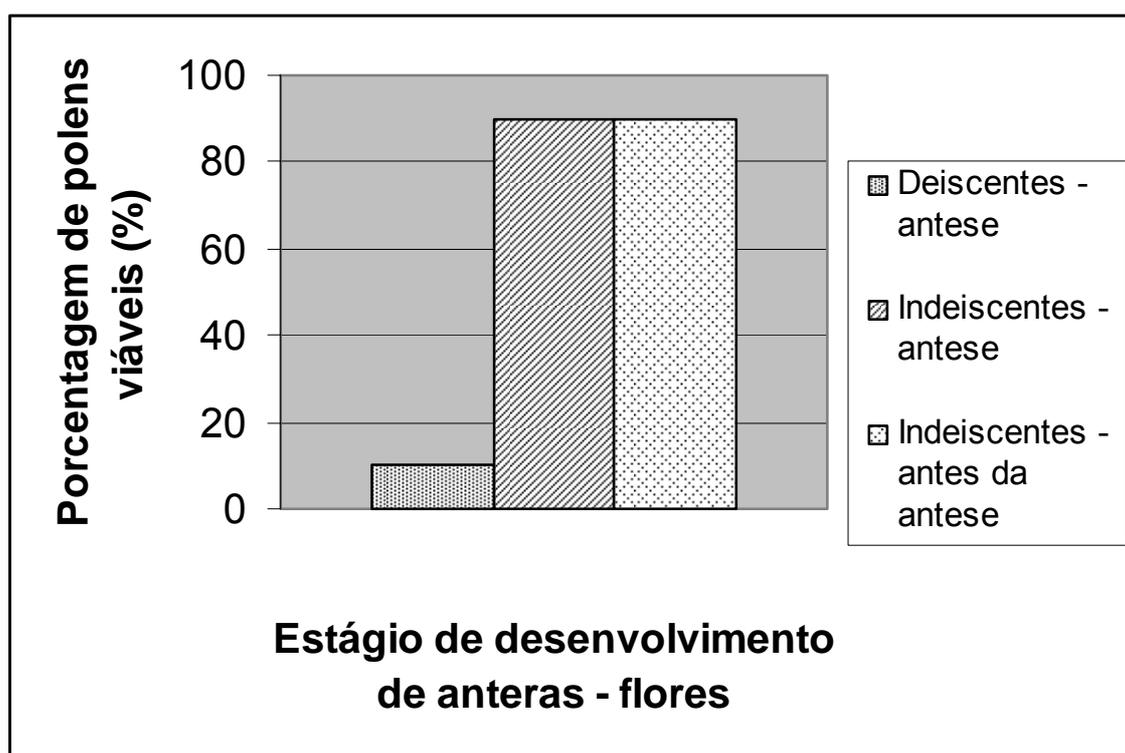
**Tabela 6:** Faixa de concentração de sacarose no meio de cultura e melhor média de germinação de pólen obtida em diferentes acessos de *Brachiaria*.

Acesso (Ploidia)	Concentração de sacarose (%)	Média de germinação de pólen (%)
<i>B. ruziziensis</i> - R50 (2N=2x)	20-10	2
<i>B. ruziziensis</i> - R112 (2N=2x)	25-10	5
<i>B. ruziziensis</i> - R44 (2N=4x)	12-10	1
<i>B. humidicola</i> - (2N=4x)	35-28	28
<i>B. decumbens</i> - D4 (2N=2x)	35-25	70
<i>B. decumbens</i> - D62 (2N=4x)	18-10	70
<i>B. decumbens</i> - D58 (2N=4x)	35-25	10
<i>B. brizantha</i> - B105 (2N=2x)	33	80

#### 4.9.3. Maturidade de anteras

Os polens coletados de anteras deiscentes apresentaram baixo potencial de germinação, cerca de 10% dos polens germinaram in vitro (Figuras 22c e Figura 23). Os polens coletados de anteras maduras indeiscentes que abriram sob luz incandescente e aqueles coletados de anteras imediatamente após o início do processo de deiscência apresentaram elevado potencial de germinação, acima de 90% (Figura 22d e Figura 23).

A melhor porcentagem do crescimento do tubo polínico foi acompanhada pelo maior vigor no crescimento quando as anteras já estão maduras, mas não deiscentes, nas flores em antese.

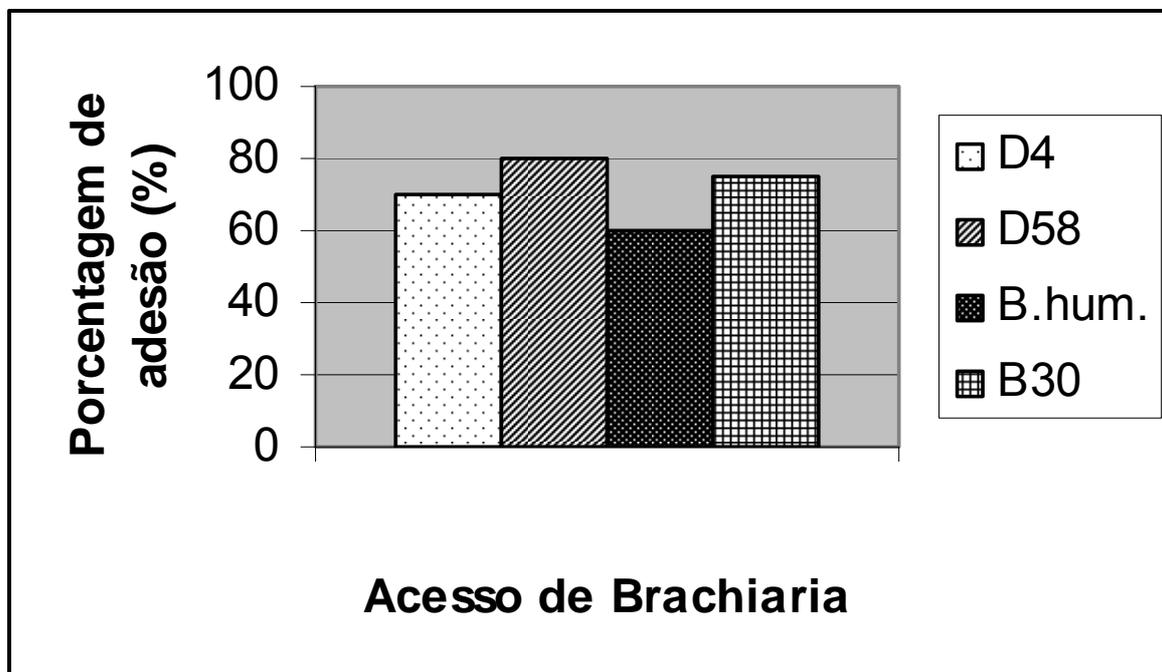


**Figura 23:** Comparação das porcentagens de polens viáveis em anteras de flores antes e durante a antese.

#### 4.9.4. Polinização in vitro

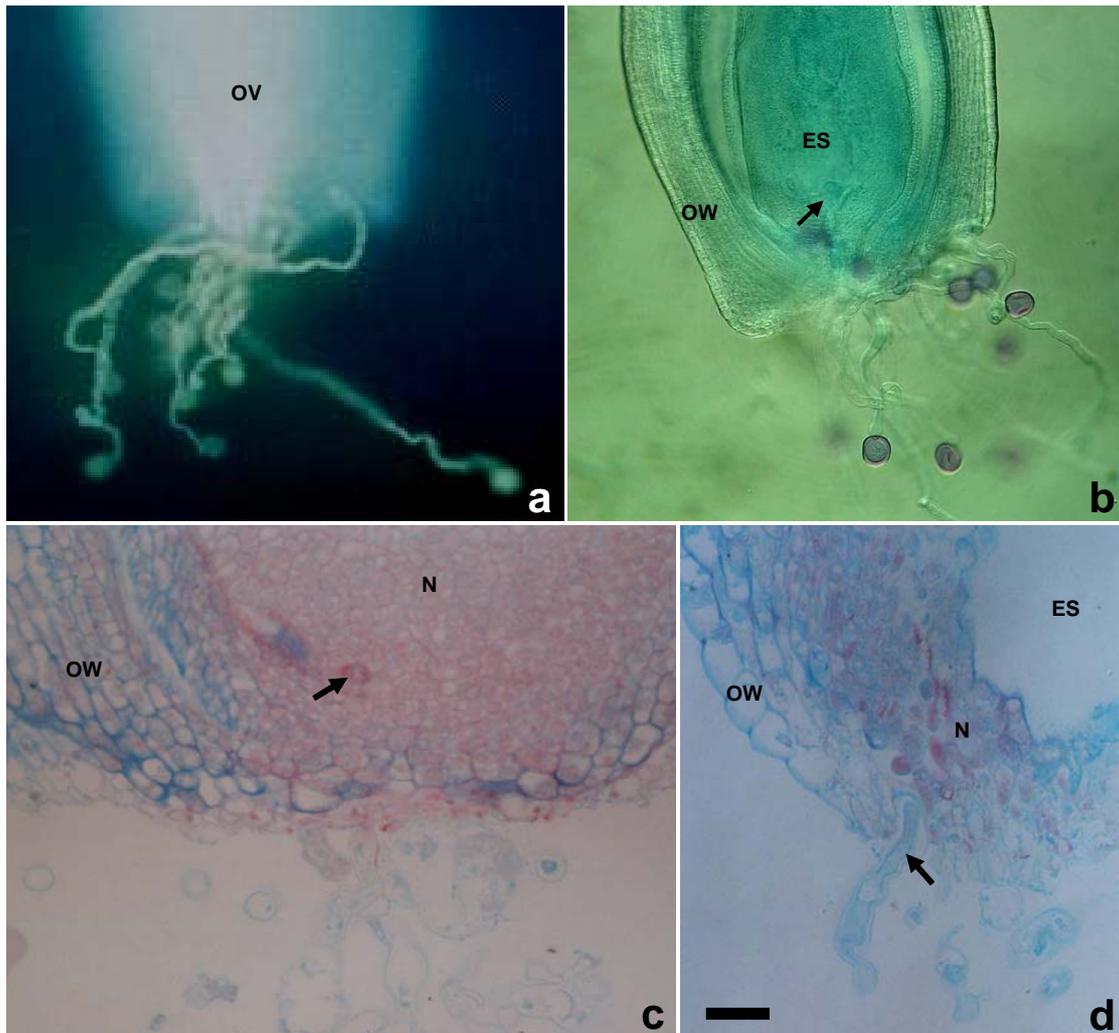
Ensaio de polinização e fertilização in vitro dependem do estabelecimento de condições para a germinação e crescimento de tubos polínicos. A

porcentagem de adesão de tubos polínicos à base de ovários mantidos em meio de cultura para germinação de pólen com sacarose a 33% de quatro acessos de *Brachiaria* após polinização in vitro é apresentada na Figura 24.



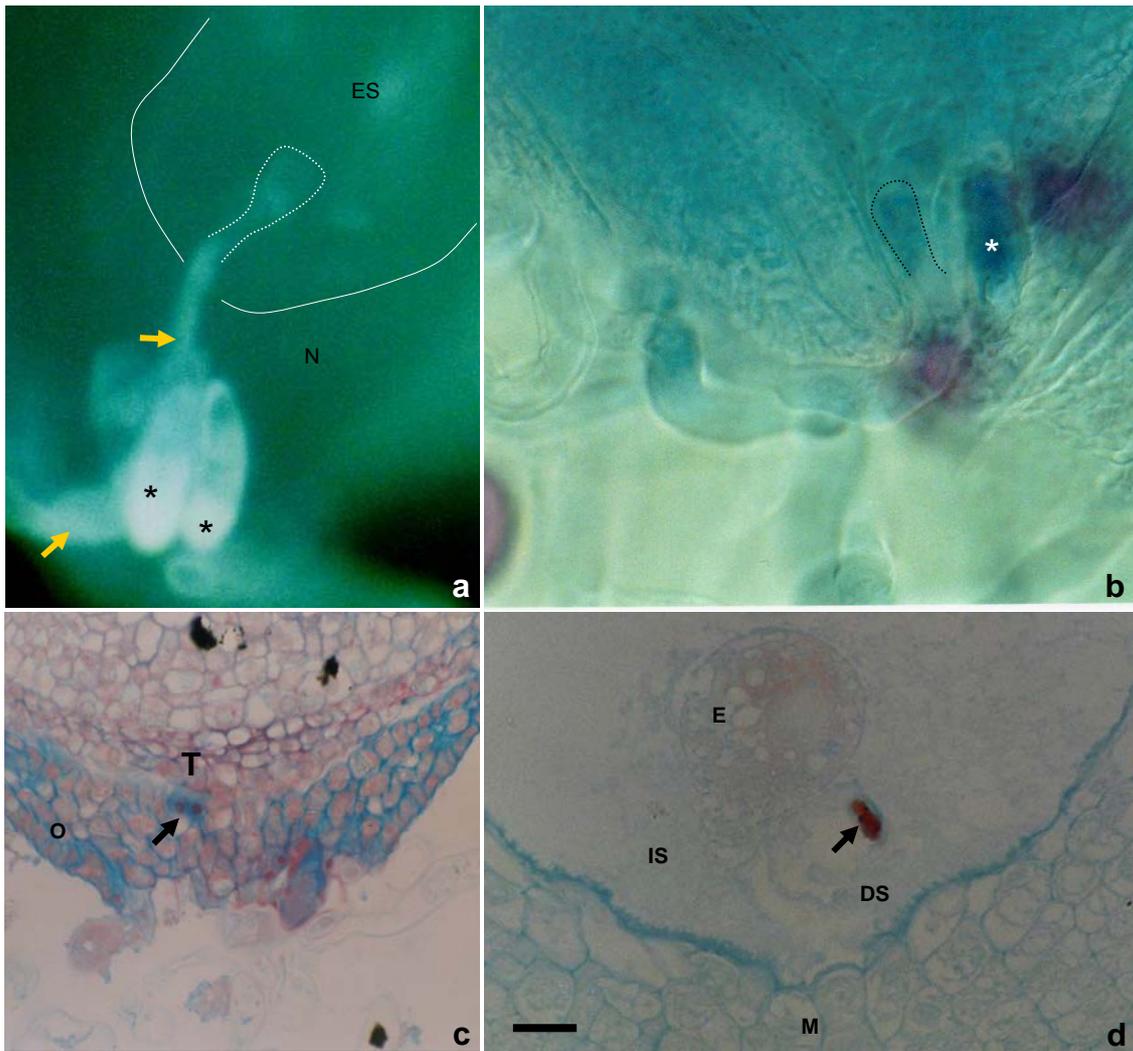
**Figura 24:** Comparação das porcentagens de tubos polínicos aderidos à base de ovários 24 horas após a polinização in vitro de diferentes acessos de *Brachiaria*: D4, acesso sexual de *B. decumbens*, D58, acesso apomítico de *B. decumbens*, B. hum, acesso apomítico de *B. humidicola*, B30, acesso apomítico de *B. brizantha*.

Na polinização in vitro, quando os polens são semeados na base do ovário, após duas horas, os tubos polínicos germinados podem ser visualizados e após 4 horas já estão localizados na base seccionada do ovário (Figura 25a; b, c, d). A penetração dos tubos é aleatória podendo ser mais próxima à micrópila entre as células nucelares (Figura 25c) ou entre as células do nucelo e a parede do ovário (Figura 25d).



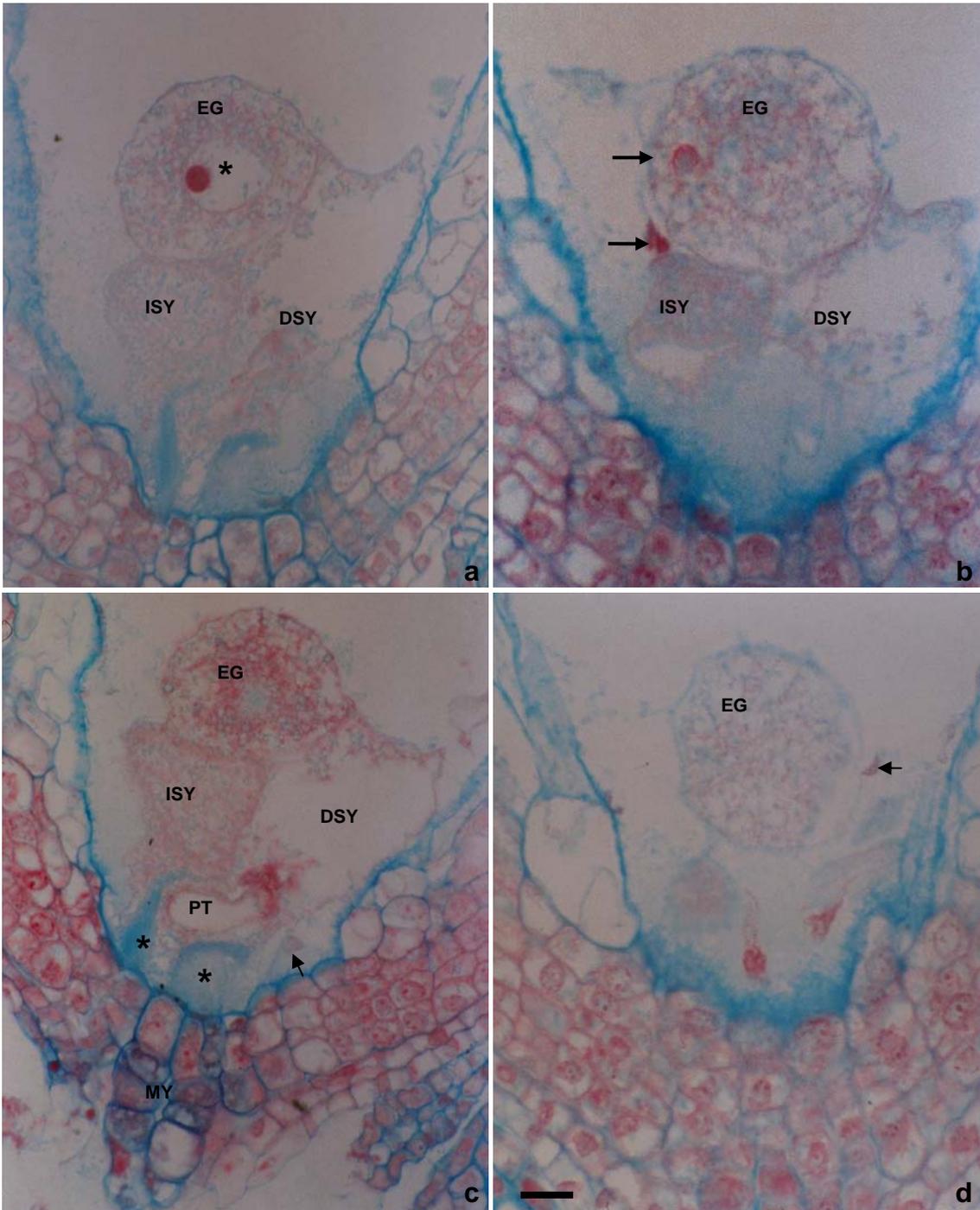
**Figura 25:** Penetração de tubos polínicos, 1 dia após polinização *in vitro*, na base seccionada de ovários de *Brachiaria*. **a-** tubos polínicos aderidos à base seccionada de ovário (OV) corado com azul de anilina e analisado sob microscopia de fluorescência; barra= 26,7  $\mu\text{m}$ . **b-** tubos polínicos aderidos à base seccionada de ovário (OV) corados com azul de anilina e analisados sob microscopia de contraste interferencial de fase. Pode se observar o aparato da oosfera (seta) no saco embrionário (ES); barra= 26,7  $\mu\text{m}$ . **c-** secção semi-fina de ovário corado com azul astra e safranina mostrando tubo polínico (seta) penetrando as células do nucelo (N); barra= 13,3  $\mu\text{m}$ . **d-** secção semi-fina de ovário corado com azul astra e safranina mostrando penetração do tubo polínico (seta) entre as células do nucelo (N) e a parede do ovário (OW); barra= 15,3  $\mu\text{m}$ .

Apenas um tubo polínico penetra o óvulo. A penetração no óvulo ocorre pelo canal micropilar que é formado pelas células do *embellum* (Figura 26a; b). Após atravessar a parede do ovário (Figura 26c) e o canal micropilar, os núcleos do tubo polínico são descarregados na sinérgide degenerada (Figura 26d) normalmente posicionada na porção micropilar do saco embrionário.

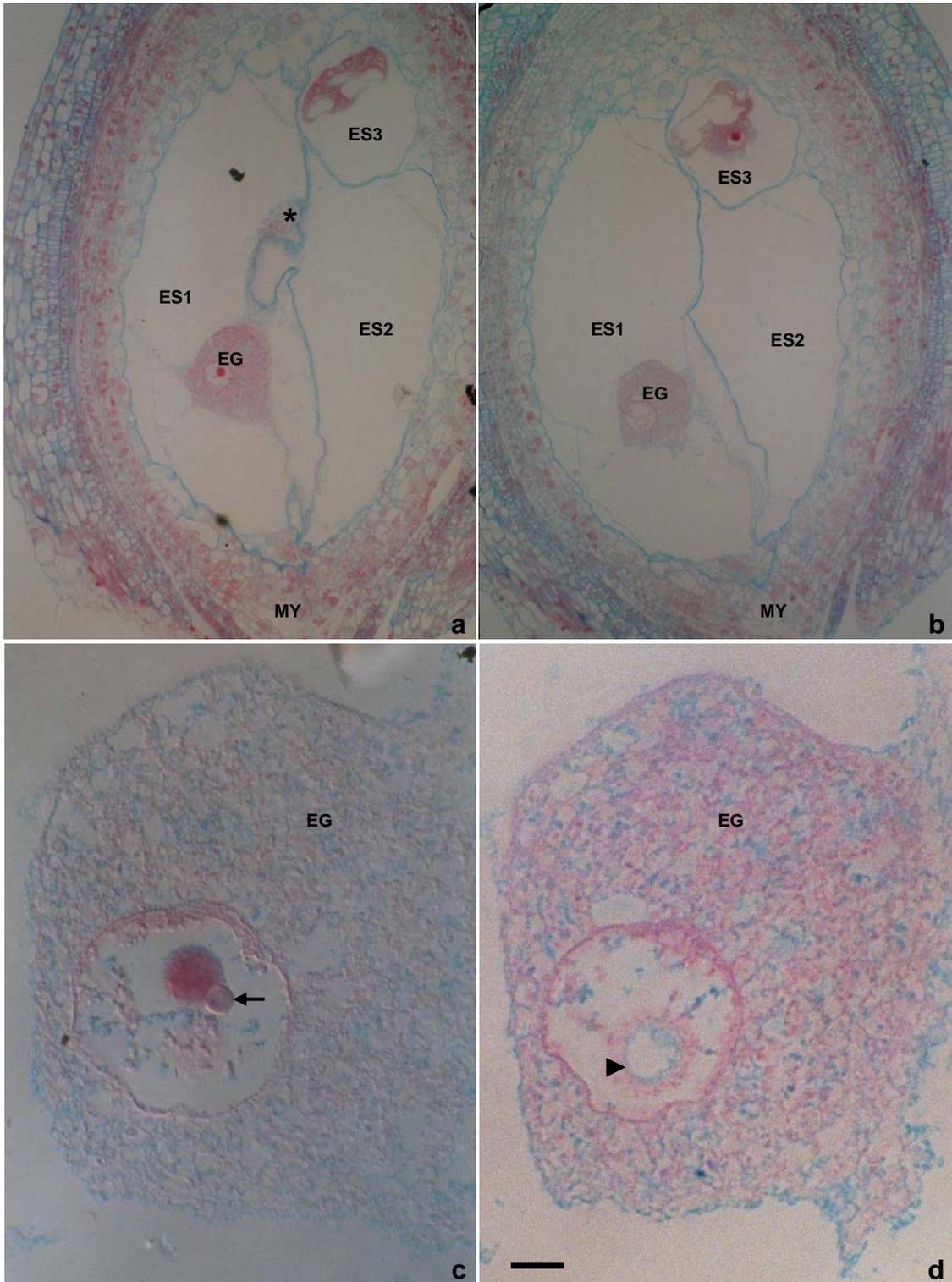


**Figura 26:** Penetração e descarga de tubos polínicos em ovários de *Brachiaria*, in vitro, 1 dia após polinização (1DAP) - **a**; **b**, e 2 dias após a polinização (2DAP) - **c**; **d**, **a**- tubo polínico (seta) corado com azul de anilina penetrando o óvulo entre o canal micopilar formado pelas células do *embellum* (\*) em microscopia de fluorescência. É possível visualizar a extremidade do tubo polínico (contorno pontilhado) no saco embrionário (ES). O limite do saco embrionário foi acentuado com uma linha contínua. barra= 2,7  $\mu$ m. **b**- tubo polínico corado com azul de anilina penetrando entre as células do *embellum* (\*), em microscopia de contraste interferencial de fase com a extremidade do tubo polínico contornada com linha pontilhada; barra= 2,7  $\mu$ m. **c**- Secção semi-fina de ovário corado com azul astra e safranina. Note dois núcleos espermáticos (seta) localizados entre os tegumentos (T) do óvulo e a parede do ovário (OW); barra= 6,7  $\mu$ m. **d**- Secção semi-fina de ovário corado com azul astra e safranina mostrando o núcleo vegetativo (seta) descarregado na sinérgide degenerada (DSY) e a oosfera (EG) contendo pequenos vacúolos; barra= 4,2  $\mu$ m.

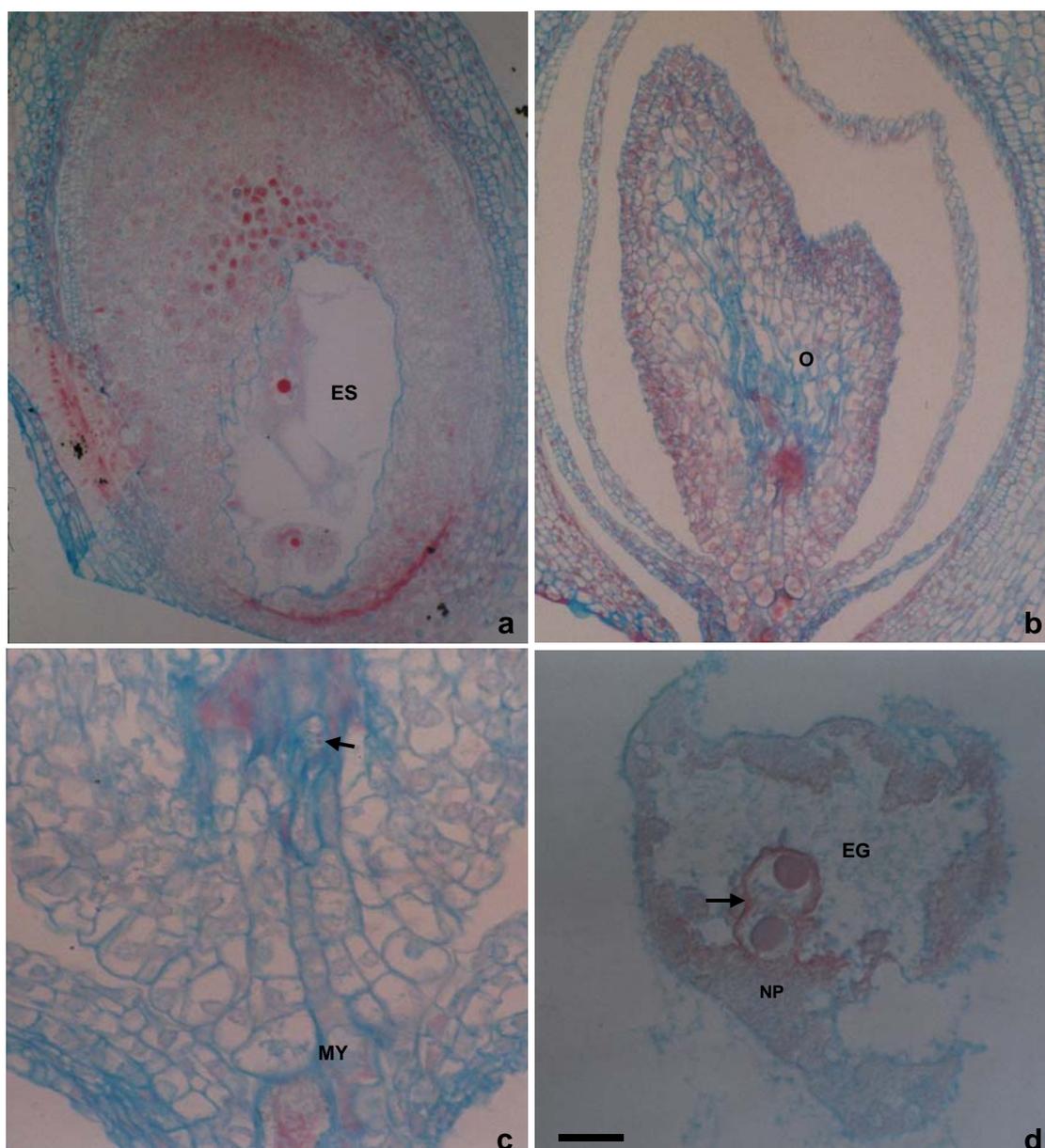
Em um dos ovários de *B. decumbens* que haviam sido polinizados e mantidos por dois dias em meio de cultura foi observada a presença de um saco embrionário na região micropilar contendo todas as células do aparato da oosfera. Uma das sinérgides apresentou aspecto degenerado (Figura 27a). Dois núcleos vegetativos foram observados dentro desse saco embrionário; um localizado entre a sinérgide intacta e a oosfera e o outro na oosfera (Figura 27b). Também foi observado resquício de tubo polínico no aparato filiforme entre as duas sinérgides (Figura 27c) e resíduo de núcleo vegetativo próximo à oosfera (Figura 27d).



Em um dos ovários de *B. humidicola* apomítica polinizados in vitro, mantidos em cultura e incluídos 2 dias após polinização foram visualizados vários sacos embrionários (Figura 28a, b). Os dois sacos embrionários (ES1 e ES2) estavam posicionados na porção micropilar do óvulo. Em ES1 foi observado um dos núcleos germinativos próximo ao nucléolo de um dos núcleos, resultantes da primeira divisão nuclear da oosfera (Figura 28c). O segundo núcleo resultante da primeira divisão nuclear na oosfera (EG) para a formação do embrião autônomo pode ser visualizado na figura 28d.



Em *B. humidicola* sexual, nos ovários polinizados in vitro, mantidos em cultura e incluídos dois dias após polinização, não foi detectado sinal da descarga do tubo polínico, nem sinal de degeneração do ovário ou do óvulo (Figura 29a). Já os ovários de *B. decumbens* sexual mantidos em cultura por dois dias continham óvulos colapsados (Figura 29b), apesar de um tubo polínico ter sido visualizado no saco embrionário colapsado (Figura 29c). Em *B. decumbens* apomítica a primeira divisão nuclear da oosfera para formação do embrião autônomo foi observada, embora núcleos masculinos ou resquícios de tubo polínico não tenham sido observados (Figura 29c).



**Figura 29:** Ovários polinizados in vitro, mantidos em cultura e incluídos 2 dias após polinização corados com azul astra e safranina e observados em microscopia de luz. **a-** saco embrionário (ES) de *Brachiaria humidicola* sem resquícios ou núcleos de tubo polínico; barra= 26,7  $\mu\text{m}$ . **b-** secção de ovário de *B. decumbens* sexual contendo óvulo colapsado (O); barra= 11,3  $\mu\text{m}$ . **c-** outra secção do mesmo ovário mostrado em **b**. Note a presença de um tubo polínico (seta) penetrando pela micrópila (MY) e alcançando o saco embrionário colapsado; barra= 6,7  $\mu\text{m}$ . **d-** secção de ovário de *B. decumbens* apomítica mostrando a primeira divisão nuclear (seta) da oosfera (EG) para formação do embrião autônomo. Neste ovário não foram observados núcleos masculinos ou resquícios de tubo polínico; barra= 2,8  $\mu\text{m}$ .

#### **4.9.5. Meio para manutenção do explante após a polinização in vitro**

Ovários de plantas sexuais e apomíticas, submetidos à cultura em meio 1, sem BAP ou GA3, apresentaram aspecto de degeneração como coloração marrom e redução da consistência dos tecidos, após uma semana. Os ovários submetidos ao meio 2, adicionado de BAP apresentaram aspecto similar àqueles submetidos ao meio 1. Os ovários submetidos ao meio 3, adicionado de GA3 apresentaram coloração esverdeada e crescimento da parede externa do ovário, porém os óvulos ficaram atrofiados.

## 5. Discussão

### 5.1. Localização dos transcritos aos clones 07, 10 e 29.

Em 2003 Rodrigues e colaboradores demonstraram por meio de *northern* reverso a expressão de clones de cDNA obtidos a partir de ovários de plantas apomíticas. A expressão do clone 07 de 242 pb foi observada durante megagametogênese de ovários de plantas apomíticas; o clone 10 de 206pb apresentou expressão em ovários na megasporogênese de apomíticos e não de sexuais, e na megagametogênese de sexuais e apomíticos. A expressão do clone 29 de 396 pb foi mais intensa nos ovários em megagametogênese de plantas apomíticas e sexuais. Nenhuma dessas seqüências apresentou similaridade com proteínas ou ESTs depositados em bancos de dados, não havendo, portanto predição de suas funções (Rodrigues et al., 2003). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, um grande número de genes, cDNA ou ESTs são isolados em curtos períodos de tempo e conseqüentemente, o número de seqüências depositadas nos bancos de dados também é crescente. No presente trabalho, as seqüências dos clones 07, 10 e 29 foram re-submetidos às análises em banco de dados, mas a homologia com outras seqüências e, portanto a predição de suas funções por comparação com seqüências homólogas não foi possível.

Por hibridização *in situ*, a expressão do transcrito 07 foi detectada durante todo o desenvolvimento do óvulo, em plantas apomíticas e nos estágios para os quais foram realizados experimentos em plantas sexuais. A detecção do transcrito foi também observada no receptáculo floral e ovário, indicando que transcrito do clone 07 pode estar envolvido na via de diferenciação floral. O transcrito 07 está presente em células que estão sujeitas à divisão nuclear

como o meiócito, as iniciais apospóricas, o coenócito e as células do nucelo, e ausente nas tétrades e sacos embrionários formados onde o processo de divisão nuclear já foi estabelecido. A expressão em sacos embrionários maduros foi restrita aos do tipo Polygonum, presente em plantas sexuais. Novos exames utilizando a técnica de hibridização in situ no estágio de megasporogênese da planta sexual assim como em outras espécies, como *B. decumbens*, devem ser realizados para esclarecer a participação do transcrito do clone 07 no desenvolvimento floral de *Brachiaria*. O estabelecimento do padrão de expressão desse clone no início da diferenciação de flores pode contribuir ao esclarecimento dos mecanismos de expressão gênica nesta etapa da reprodução vegetal.

Por hibridização in situ, o transcrito 10 foi detectado exclusivamente na base das sinérgides dos sacos embrionários maduros da planta apomítica. Nesta fase a diferença marcante entre apomíticas e sexuais é a presença da fertilização da oosfera e desenvolvimento autônomo do embrião. Como descrito anteriormente, as sinérgides são células importantes no processo de fertilização de plantas superiores (van Went & Willemse, 1984). Elas produzem substâncias responsáveis pela atração do tubo polínico como, por exemplo, ZmEF1 um fator de atração exclusivo de *Zea mays* (Márton et al., 2005) e MYB98 descrito em *A. thaliana* (Kasahara et al., 2005) e *BbrizMAPK*, descrito no presente trabalho, que pode estar envolvido com o desenvolvimento do embrião autônomo, que foi detectado somente nas sinérgides de saco embrionário apospórico.

Na hibridização in situ com transcrito referente ao clone 29 pode-se destacar a detecção de expressão forte e restrita ao meiócito, no estágio inicial do

desenvolvimento do óvulo das plantas apomíticas. Neste estágio a meiose é interrompida e o destino das tétrades formadas é a degeneração. Nas tétrades de megásporos o transcrito não foi detectado. Expressão foi verificada em todas as células nucelares de óvulos contendo SE em estágio cenocítico e maduro. É importante ressaltar que no coenócito e no aparato da oosfera dos ovários de apomíticas foi observada expressão enquanto nas sexuais não.

Considerando que o desenvolvimento dos sacos embrionários meiótico e apospórico ocorre devido a uma expressão diferencial de genes, os padrões de expressão dos transcritos relativos aos clones 7, 10 e 29 os tornam seqüências de interesse na compreensão da apomixia. Assim, a extensão destas seqüências por 5' RACE permitirá uma comparação mais precisa em bancos de dados, o que auxiliará na inferência de função para esta seqüência.

## **5.2. Localização dos transcritos de *BbrizMYO*, *BbrizMAPK* e *BbrizAQP***

A análise dos experimentos de hibridização *in situ* sugere a participação dos três clones em diferentes períodos do desenvolvimento do saco embrionário para *B. brizantha* sexual e apomítica apospórica. Somente *BbrizMYO* foi expresso em ambos os tipos de saco embrionário, apresentando atraso na expressão em sacos embrionários do tipo Polygonum das plantas sexuais.

*BbrizAQP* e *BbrizMAPK* foram expressos especificamente em plantas apomíticas - *BbrizAQP* apresentou expressão em células do saco embrionário e dos tegumentos, enquanto *BbrizMAPK* hibridizou em diferentes células do óvulo, e notavelmente nas sinérgides. Estas são células muito ativas no saco embrionário, com citoplasma denso e considerável quantidade de ácidos nucléicos e proteínas (Tilton, 1981). Em plantas nas quais ocorre fertilização,

elas mostram um elevado número de retículo endoplasmático e vesículas que estão associadas à maturação do saco embrionário (Koscinska-Pajak & Bednara, 2006). Sinérgides desempenham papel importante na atração e direcionamento do tubo polínico durante o processo de fertilização em plantas superiores (Jensen & Fisher, 1968; Kapil & Bhatnagar, 1975; Mogensen, 1978; van Went & Willemse, 1984; Russel, 1992; Higashiyama, 2002). Interessantemente, em *Chondrilla juncea*, uma apomítica obrigatória na qual o desenvolvimento do embrião e do endosperma é independente de fertilização, as sinérgides permanecem indiferenciadas (Koscinska-Pajak & Bednara, 2006). Nogler (1984) sugeriu a existência de um estado de balanço entre apomixia e sexualidade que favoreceria a apomixia durante o desenvolvimento do saco embrionário e formação da semente. Atualmente, pensa-se que apomixia é consequência de um rearranjo no desenvolvimento que constitui a via normal da sexualidade (Grimanelli et al., 2001; Koltunow & Grossniklaus, 2003; Tucker et al., 2003).

Pelas diferenças na morfologia do óvulo e do saco embrionário durante o desenvolvimento, é possível reconhecer pontos específicos na via que leva à formação do saco embrionário meiótico ou apospórico. Um dos pontos relevantes é a falha na meiose e a diferenciação das iniciais apospóricas. Embora a meiose pareça ser completa em óvulos de *B. brizantha* apomítica (Araujo et al., 2000), a tétrade de megásporos degenera e muitas iniciais apospóricas surgem do nucelo. Tem sido sugerido que o desenvolvimento das iniciais apospóricas pode influenciar diretamente a falha no programa sexual por meio de modificação na expressão gênica, mas a identidade molecular dessas células e o relacionamento das vias meiótica e apospórica ainda são

desconhecidos (Tucker et al., 2003). Outro ponto é que o desenvolvimento autônomo do embrião ocorre normalmente apenas em plantas apomíticas. Em *Brachiaria*, a embriogênese pode ocorrer antes da fertilização (Dusi & Willemse, 1999; Araujo et al., 2000). Isto significa que o desenvolvimento autônomo da oosfera ocorre independentemente da polinização ou fertilização da célula central.

Nesse trabalho, o padrão de expressão de *BbrizMYO*, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK* na vias meióticas e apospóricas foram correlacionados com suas funções como sugerido pela sua identidade molecular.

Em geral, a miosina funciona interagindo com a actina fornecendo a força motora para muitos movimentos celulares (Lodish et al., 2001; Alberts et al., 1994). Em plantas, a miosina está envolvida com o fluxo citoplasmático celular ou simplástico que produz uma reorganização citoplasmática durante a reprodução celular (revisado por Shimmen & Yokota, 2004). A expressão de *BbrizMYO* em ovários apomíticos, excluindo o nucelo, foi detectada em dois estágios de desenvolvimento do óvulo. Inicialmente, a expressão foi detectada no meiócito, antes da divisão, quando as células estão em expansão e o rearranjo citoplasmático leva à polarização do conteúdo celular preparando para a divisão. Mais tarde, quando o saco embrionário jovem está presente; os transcritos de *BbrizMYO* foram detectados no aparato da oosfera e célula central, ao mesmo tempo em que estas células estão se posicionando umas em relação às outras. A expressão foi muito forte no aparato da oosfera, especialmente nas sinérgides, e foi também observada em óvulos sexuais. Elementos do citoesqueleto intra e intercelular participam nos eventos de fertilização, direcionamento das células espermáticas e migração dos núcleos

masculinos (Russel, 1993). De fato, em plantas sexuais e apomíticas de *Brachiaria* ambos os eventos ocorrem, uma vez que a apomixia é pseudogâmica, ou seja, uma célula espermática é necessária para a formação do endosperma (Alves et al., 2001). Filamentos de actina foram observados em oosfera e célula central de *Torenia fournieri* em um arranjo radial, e foram localizados em abundância próximos ao aparato filiforme e em uma sinérgide em particular (Fu et al., 2000). Estendendo este fato para *Brachiaria*, um possível local de filamentos de actina seria coincidente com a localização dos transcritos de *BbrizMYO*. Por outro lado, nos sacos embrionários meióticos, as células são distribuídas em ambos os pólos, e a expressão de *BbrizMYO* é também claramente polarizada nos pólos calazal e micropilar. Quando o saco embrionário torna-se completamente organizado, os transcritos de *BbrizMYO* tornaram-se completamente ausentes, e a expressão foi restrita às células nucelares. Neste momento, o saco embrionário está se preparando para a fertilização. Os transcritos de *BbrizMYO* não foram detectados em coenócitos, um estágio de desenvolvimento do saco embrionário no qual a cariocinese ocorre repetidamente, de acordo com observações que a miosina intacta é necessária para citocinese mas não para cariocinese (Yumura et al., 1984; De Lozanne & Spudich, 1987; Solomon, 1987; Lodish et al., 2001). Íons de cálcio são requeridos para o crescimento do tubo polínico e regulam os movimentos citoplasmáticos em plantas (Tominaga et al., 1983). Em elevadas concentrações de cálcio, a miosina pode se desestruturar, tornando o movimento citoplasmático irreversível (Yokota et al., 1999). Em *B. brizantha* cv. Marandu, a degeneração de uma das sinérgides foi associada com a descarga do tubo polínico no saco embrionário (Alves, 2000). A expressão de *BbrizMYO*,

que foi previamente detectada em ambas as sinérgides desta mesma planta, foi mantida em apenas uma das sinérgides, como é também observado nas plantas sexuais. É possível que o controle da fertilização, incluindo a degeneração das sinérgides, inicia-se com o decréscimo dos níveis dos transcritos e degeneração das proteínas pela elevada concentração de cálcio.

Em relação à análise de *BbrizAQP* em *B. brizantha*, a expressão foi reservada a ovários contendo sacos embrionários jovens e maduros pertencentes ao acesso apomítico. Aquaporinas (AQP) controlam o fluxo de água através da membrana plasmática (Lodish et al., 2001). Em plantas, AQP desempenham um papel importante no transporte de proteínas dentro ou fora de corpos protéicos durante o desenvolvimento e germinação de sementes (Chrispeels & Maurel, 1994), da mesma forma elas podem ter um papel no desenvolvimento de cariopses de *B. brizantha*. A ausência dos transcritos de *BbrizAQP* no nucelo e sua presença nos tegumentos são condizentes com o destino desses tecidos; uma vez que o nucelo irá degradar, e os tegumentos iniciarão uma fase de diferenciação. Como nenhum sinal de expressão de *BbrizAQP* foi detectado nos óvulos de plantas sexuais de *B. brizantha*, *BbrizAQP* pode estar envolvido em eventos específicos de plantas apomíticas. De fato, relatos de AQP com expressão tecido-específicas em plantas são freqüentes (Ciavatta et al., 2001; Chaumont et al., 2001; Hakman & Oliviusson, 2002). AQP parece expressar-se preferencialmente em tecidos com alta atividade metabólica (Barrieu et al., 1998), tais como as sinérgides (Tilton, 1981). Isto pode explicar o elevado nível de expressão de *BbrizAQP* encontrado não somente em oosfera mas especialmente nas sinérgides. AQP tem elevada identidade de amino-ácidos com “Big Brain protein” (BIB) de *Drosophila*, que contém um

grande domínio C-terminal com vários possíveis sítios consenso para modulação mediada por quinase (Burriss et al., 1998; Yanocho & Yool, 2002). A expressão de BIB em oócito de *Xenopus* sugere que a ativação in vivo pode resultar numa despolarização da membrana que pode então ativar a partenogênese por meio de uma quinase que estaria envolvida na via de sinalização intracelular. (Wolf, 1974; Yanocho & Yool, 2002). Por associação, é possível que a expressão de *BbrizAQP* em sacos embrionários maduros de plantas apomíticas, mas não em plantas sexuais indique o seu envolvimento no desenvolvimento autônomo do embrião em *Brachiaria*. A oosfera não-reduzida se desenvolveria imediatamente em embrião por meio de um suprimento contínuo de nutrientes, sem período de latência. O elevado sinal de expressão de *BbrizAQP* observado no aparato da oosfera, principalmente nas sinérgides, pode estar relacionado à função destas células na atração e recepção do tubo polínico durante a fertilização (van Went, 1970; Koscińska-Pajak & Bednara, 2006; Friedman, 2006). A expressão de *BbrizAQP* foi considerável durante a maturação do saco embrionário apospórico e provavelmente está relacionada ao desenvolvimento do embrião e fertilização da célula central. Em *B. brizantha* apomítica, a fertilização é restrita à célula central para formar o endosperma (Alves et al., 2001); dessa forma, existe a necessidade de atração de uma célula espermática para a célula central enquanto a outra célula espermática não fertiliza a oosfera que se desenvolve autonomamente. Além disso, em plantas, já foi descrito que a fosforilação aumenta a atividade da AQP (Chrispeels et al., 1999).

Nossos resultados de hibridização *in situ* apontaram uma expressão significativa de *BbrizMAPK* nas sinérgides de sacos embrionários apospóricos maduros, principalmente na região micropilar.

Proteínas quinases ativadas por agentes mitógenos (MAPK) estão envolvidas na sinalização de diversos processos celulares. Em leveduras, esses processos incluem acasalamento, manutenção da integridade da parede celular e formação de esporos (Herskowitz, 1995). Em animais, MAPKs desempenham um importante papel na mitose e na sinalização de estímulos por fatores de crescimento. Em plantas, MAPK participa no crescimento, na ação de hormônios e na dinâmica do citoesqueleto (Heberle-Bors, 2001). A expressão de *BbrizMAPK* também está presente no nucelo, e particularmente, se apresenta mais elevada nas sinérgides de plantas apomíticas de *Brachiaria*. Após a fertilização, o transcrito não foi detectado sob as condições experimentais deste trabalho. Diferentes níveis de cDNA de MAPK foram detectados em órgãos distintos de *Medicago sativa*. Estes níveis eram dependentes da fase do ciclo celular (Jonak et al., 1993). Transcritos de MAPK foram também detectados durante o desenvolvimento de órgãos reprodutivos de *Petunia hybrida* (Decroocq-Ferrant et al., 1995). A presença de transcritos de *BbrizMAPK* nas sinérgides e sua ausência nos sacos embrionários após a fertilização, bem como nos embriões desenvolvidos de forma autônoma, indica que *BbrizMAPK* pode ter um papel importante nos eventos relacionados à maturação do saco embrionário, preparando-o para a fertilização e início do desenvolvimento do embrião.

É possível que *BbrizMAPK* participe dos eventos que resultam na orientação do tubo polínico para a micrópila e finalmente para o aparato da oosfera. Por

outro lado, *BbrizMAPK* pode estar envolvida na indução da fase S na oosfera, ativando o desenvolvimento autônomo do embrião. O período de expressão de *BbrizMAPK* não coincide com a transcrição de AtSERK (*Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinases) em ovários de *B. decumbens*, para o qual nenhuma associação ao desenvolvimento autônomo do embrião foi verificada. O transcrito de SERK foi encontrado em todas as células do saco embrionário de pistilos polinizados de *B. decumbens* sexual e apomítica, com baixos níveis de expressão na oosfera de óvulos de plantas apomíticas antes da polinização, e ausente em qualquer estágio de desenvolvimento dos embriões (Dusi, 2001).

Estas três seqüências de cDNA foram previamente relacionadas ao desenvolvimento do ovário por meio de *northern* reverso. Análises por meio de hibridização *in situ* indicaram que as sinérgides compõem a principal área de modulação de expressão durante o desenvolvimento do saco embrionário, sugerindo seu envolvimento na maturação dessa estrutura, fertilização e embriogênese. Todos esses eventos em plantas apomíticas são diferenciados das plantas sexuais e estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento autônomo do embrião, uma característica do modo de reprodução apomítico. Dessa forma, as sinérgides podem desempenhar um papel crucial, não somente no momento da fertilização, mas também no desenvolvimento autônomo da oosfera não-reduzida, característica peculiar de plantas apomíticas. O perfil de expressão de *BbrizMYO*, *BbrizAQP*, *BbrizMAPK* observado nas sinérgides pode ser o primeiro passo para o entendimento de padrões moleculares de expressão gênica nestas plantas apomíticas naturais.

### 5.3. Localização do transcrito de *BbrizREC* (clone 20) em *B. brizantha* e *B. decumbens*

Rodrigues e colaboradores (2003), por meio de análise direta no banco de dados de proteína (BLASTX) verificaram similaridade do clone 20, de 498pb, com uma proteína descrita em *Arabidopsis thaliana*, ID 15239302, e-value 0,002. Em seguida, a seqüência traduzida do clone 20 foi submetida ao PSI-BLAST, ferramenta que permite busca interativa produzindo matriz de registro posição-específica para futuras pesquisas (McGinnis & Madden, 2004). Após quatro interações, 10 proteínas apresentaram o mesmo padrão na conservação de alguns domínios. Estas proteínas foram alinhadas com o CLUSTALW à proteína traduzida da seqüência do clone 20 e verificou-se a presença de três resíduos de Cys categoricamente conservados na porção C-terminal dessas proteínas. Como a pesquisa em banco de dados com BLASTP e BLASTN não adicionou maiores informações sobre homólogos, os autores recorreram aos bancos de domínios (PFAM, CDD e INTERPRO) para identificar homólogos distantes que pudessem contribuir para o esclarecimento da função do clone 20. Os resultados obtidos com PRODOM indicaram índice de similaridade de *Arabidopsis thaliana* 15239302 com PD462754 que continha cinco proteínas de sulfobactérias e seus vírus. Estas proteínas também continham os resíduos de Cys conservados na porção C-terminal. Buscas no CDD mostraram alto índice de similaridade com COG 1468, anotada como exonuclease da superfamília RecB possivelmente envolvida na replicação, recombinação ou reparo de DNA. Esta família é relacionada no PFAM à entrada DUF83 (domínio 83 de função desconhecida). De posse desses dados foi realizado um alinhamento que mostrou que motivos contendo resíduos de ligação a metal da superfamília RecB eram também conservados nas outras proteínas. A partir desses

resultados foi sugerido que o clone 20 é uma nuclease metal dependente que guarda um parentesco distante com a superfamília RecB (Rodrigues et al., 2003). No presente trabalho, a seqüência inicial do clone 20 foi amplificada de 498pb para 1037 pb no sentido 5', e novas análises de bioinformática foram realizadas. Buscas contra diferentes bancos de dados utilizando-se BLASTX e BLASTP (utilizando-se a seqüência traduzida), mostraram homologia do clone 20 com uma série de proteínas de função desconhecida, incluindo ID 15239302 de *Arabidopsis thaliana*, como descrito por Rodrigues e colaboradores (2003). No entanto, o melhor resultado (BLASTX 2.2.15, banco de dados 'nr', *e-value* =  $3e-128$  e *bit core* = 461) foi obtido com uma proteína de *Oryza sativa* gil115461825l com a qual o clone 20 apresentou alta identidade de seqüência. O resultado obtido anteriormente (Rodrigues et al., 2003) foi confirmado e o clone 20 denominado *BbrizREC*. Por meio de hibridização in situ em secções de ovário os transcritos foram detectados exclusivamente em tecidos do óvulo, tanto de plantas apomíticas quanto de sexuais. Sua expressão em plantas sexuais de *B. brizantha* foi detectada de forma efêmera entre estágio cenocítico octanucleado e o início do processo de celularização. Durante a megasporogênese a expressão de *BbrizREC* foi similar nos óvulos de plantas apomíticas de duas espécies, *B. brizantha* e *B. decumbens*; detectada primeiramente em poucas células nucleares, mas não na célula-mãe do megásporo e em seguida em todas as células do nucelo e também no meiócito. Em fase posterior do desenvolvimento quando as iniciais apospóricas já estão presentes a detecção do transcrito foi restrita a células nucleares e de forma bem discreta. Em *B. decumbens*, a presença do transcrito também não foi detectada no meiócito de plantas sexuais, mas estava presente nas células

nucleares e nos tegumentos. Em contraste com *B. brizantha*, em *B. decumbens* o transcrito foi detectado em óvulos contendo sacos embrionários diferenciados de plantas apomíticas e sexuais. O complexo enzimático RecBCD é o principal componente da via para recombinação homóloga em *E. coli*. Embora o nível de expressão de RecBCD nas células de *E. coli* seja baixo (10 cópias por célula), mutações neste complexo enzimático afetam a recombinação durante a conjugação das bactérias (Arnold & Kowalczykowski, 2001). Em *E. coli*, o locus  $\chi$  (chi) estimula a frequência de recombinação genética na vizinhança. A interação de RecBCD com  $\chi$  causa mudanças na função do complexo enzimático que são manifestadas pelo decréscimo da atividade de nuclease de RecBCD protegendo o DNA. Dessa forma, em bactéria,  $\chi$  é um regulador de RecBCD e conseqüentemente da recombinação (Arnold & Kowalczykowski, 2001). Nos eucariontes a recombinação ocorre durante a prófase I da meiose, por meio de quebra e reunião das cromátides não irmãs (Swanson et al., 1969). O principal resultado da recombinação, processo altamente preciso, é o mesmo para procariontes ou eucariontes: duas moléculas de DNA homólogas trocam partes (*crossing-over*) sem que haja perda ou ganho sem erro de um único nucleotídeo nas cromátides envolvidas (Schrank et al., 1996). Em plantas apomíticas ocorre um distúrbio no processo meiótico, resultando na diplosporia ou aposporia (Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992; Carman, 1997). Rodrigues e colaboradores (2003) especularam, com base nos resultados obtidos por *Northern* reverso, que a expressão de um gene pertencente à família das recombinases na fase inicial do desenvolvimento de ovários de plantas apomíticas poderia estar relacionada com a identidade das iniciais apospóricas, engatilhando um programa mitótico e sugeriram que *BbrizREC* poderia estar

relacionado com recombinação e replicação do DNA. Nas plantas com flores a megasporogênese (meiose feminina) e, portanto a recombinação ocorre na célula-mãe do megásporo. Após a permuta, as enzimas envolvidas no sistema de reparo fazem uma varredura para detectar se há falhas nas cromátides novas (Alberts et al., 1994). Sabe-se que as recombinases, às quais pertence o complexo RecBCD, promovem cortes próximos ao centro de permutação (Schrank et al., 1996). De modo análogo ao sistema de reparo em *E. coli*, pode-se especular que nas plantas sexuais a região de permuta pode agir como um regulador da atividade de nuclease de *BbrizREC*. Nas plantas apomíticas, o processo de recombinação que deveria ocorrer na célula-mãe do megásporo é bloqueado e, de forma interessante, nossos dados mostram acúmulo do transcrito *BbrizREC* no meiócito. Este acúmulo de *BbrizREC* degradaria o genoma do meiócito gerando falhas drásticas que inviabilizariam a formação dos megásporos. Nas apomíticas, a morte programada do meiócito ou da tétrade ocorre simultaneamente com o aparecimento das iniciais apospóricas, as quais não apresentaram expressão do transcrito *BbrizREC* em nenhuma das espécies estudadas. Estas observações nos levam a especular que *BbrizREC* esteja envolvida numa via de sinalização capaz de redirecionar o programa de desenvolvimento do óvulo, viabilizando a posterior diferenciação das iniciais apospóricas que darão origem ao saco embrionário do tipo *Panicum*, característico das plantas apomíticas de *Brachiaria*.

*Northern blot* foi conduzido no sentido de verificar a atividade desse gene em outros órgãos de *B. brizantha* como folhas, raízes e anteras. Os resultados obtidos por meio desta técnica mostraram que *BbrizREC* é expresso também em raízes de plantas sexual e apomítica de *B. brizantha*. Entretanto, por

*northern blot*, a hibridização de *BbrizREC* (transcritos do clone 20) com RNA de ovários não foi detectada sob as condições nas quais esse experimento foi conduzido. As raízes são órgãos que apresentam crescimento contínuo e são constituídas basicamente de três regiões distintas; a região de divisão celular, a de alongamento e a de maturação (Raven et al., 1992) de alta atividade metabólica. Investigações *in situ* permitirão detectar as regiões de expressão de *BbrizREC* nesse tecido. O papel de *BbrizREC* em ovários em megagametogênese de *B. brizantha* e *B. decumbens* deve ser igualmente melhor investigado, buscando determinar sua especificidade celular, o grau de maturação do saco embrionário e sua relação com fenômenos de fertilização em plantas apomíticas e sexuais que sucedem a megagametogênese. Nossos resultados apontaram importante acúmulo de transcrito de *BbrizREC* em momentos precoces e decisivos da diferenciação de sacos embrionários do tipo *Panicum* e *Polygonum* sugerindo um papel no processo de desvio da via sexual e início do desenvolvimento da via apomítica em ovários. Outros autores sugerem que genes como *ASG1* (Chen et al., 2005), *HPDEF* (Gerin et al 2000), *PpSERK* e *PpAPOSTART* (Albertini et al., 2005) participam nesta mesma via. *AGS1* é expresso nas iniciais apospóricas e células do saco embrionário apospórico, e durante a microsporogênese, e também em sacos embrionários e embriões jovens de plantas apomíticas e sexuais de *Panicum maximum*. *HPDEF* foi observada nos primórdios de estames e pétalas, e durante o desenvolvimento do óvulo, desde os primórdios até a antese, de *Hieracium piloselloides* (Guerin et al., 2000). Em *Poa pratensis*, a expressão de *PpSERK* foi detectada nas células-mãe do megásporo de plantas sexuais, mas não de apomíticas. Nestas, o sinal foi detectado apenas em algumas células nucleares

(Albertini et al., 2005). Em relação a estes sistemas, a expressão de *BbrizREC* em ovários de *Brachiaria* é mais precoce e restrita a momentos decisivos ao desenvolvimento de sacos embrionários de plantas apomíticas, a degeneração dos produtos do meiócito e o aparecimento das iniciais apospóricas.

#### 5.4. Expressão de genes supostamente relacionados à apomixia

Em 1999, Chen e colaboradores isolaram e caracterizaram *ASG1*, um gene específico, de plantas apomíticas de *Panicum maximum*. Recentemente, estudos de hibridização *in situ* revelaram o perfil de expressão desse gene durante o desenvolvimento de ovário de plantas apomíticas e sexual de *P. maximum*. Os resultados desse trabalho indicam que *ASG1* é expresso: nas iniciais apospóricas e células do saco embrionário apospórico, durante a microsporogênese, também em sacos embrionários e embriões jovens de plantas apomíticas e sexuais (Chen et al., 2005). Um outro gene, *HPDEF*, foi isolado de *Hieracium piloselloides*, um apomítico apospórico (Guerin et al., 2000). Pela técnica de hibridização *in situ*, a expressão deste gene foi observada nos primórdios de estames e pétalas, indicando sua atividade funcional em B, de acordo com o modelo ABC proposto para desenvolvimento floral. A presença do transcrito foi também detectada durante o desenvolvimento do óvulo, desde os primórdios até a antese, indicando sua participação nesse evento. A expressão de *HPDEF* não foi detectada na célula-mãe do megásporo nos sacos embrionários sexuais ou apospóricos. Nas plantas apomíticas, a expressão foi transientemente *down-regulated* e restrita à região calazal, onde ocorre a diferenciação dos sacos embrionários apospóricos (Guerin et al., 2000). Dois genes foram isolados e caracterizados

de *Poa pratensis*, *PpSERK* e *PpAPOSTART* (Albertini et al., 2005). Nesse trabalho, análises de RT-PCR revelaram que os dois alelos de *PpSERK* apresentaram expressão em folhas e raízes de plantas apomíticas, sexuais e também no genótipo recombinante. Porém a expressão de *PpAPOSTART* foi restrita a inflorescências. Com o auxílio da hibridização in situ, foi realizada a localização dos transcritos de *PpSERK* e *PpAPOSTART* em plantas apomíticas, sexuais e também no genótipo recombinante durante os estágios iniciais de desenvolvimento do óvulo. A expressão de *PpSERK* foi detectada nas células-mãe do megásporo de plantas sexuais, mas não de apomíticas. Nestas, o sinal foi detectado apenas em algumas células nucelares. Enquanto a presença de *PpAPOSTART* foi detectada durante a micro e megasporogênese. Nesta, o transcrito foi detectado: no megásporo, células nucelares e também nas células do saco embrionário tanto em plantas apomíticas quanto em sexuais (Albertini et al., 2005).

### **5.5. Polinização in vitro**

O processo de fertilização depende de fatores esporofíticos e gametofíticos. Por meio da polinização e fertilização in vitro pode-se contornar a maioria das barreiras que impedem a fertilização in vivo. Porém a sincronia entre o desenvolvimento dos gametófitos masculino e feminino é fundamental (Weterings & Russel, 2004) mesmo utilizando técnicas in vitro. Existe uma correlação entre o crescimento da flor, o desenvolvimento da antera e o estágio citológico do desenvolvimento do pólen (Raghavan, 1988). Em secções de anteras de arroz, pré-deiscentes e deiscentes, observou-se hidrólise progressiva de amido em um dos lados do pólen. Na região de hidrólise

observou-se um ou dois núcleos espermáticos e um núcleo vegetativo, indicando que o núcleo espermático se divide após o acúmulo de amido no pólen justamente antes da deiscência da antera (Raghavan, 1988). A elevada taxa de germinação, 90%, de polens de *Brachiaria* coletados de anteras pré-deiscentes ou imediatamente após a deiscência corroboram a sincronia entre o desenvolvimento da antera e o estágio de desenvolvimento do pólen e a importância do estágio de maturação do pólen para o processo de emissão e alongamento do tubo polínico. Verificou-se que a germinação de polens in vitro é altamente dependente da espécie e da concentração de sacarose usada (Tabela 6). *B. decumbens* sexual diplóide (D4) e apomítica tetraplóide (D62, D58) e *B. brizantha* sexual diplóide (B105) apresentaram boa capacidade de germinação e crescimento de tubo polínico in vitro, nas condições testadas e são, portanto boas candidatas a experimentos de fertilização in vitro. A maior viabilidade observada nos polens de plantas sexuais quando comparadas com as apomíticas, é condizente com trabalhos publicados anteriormente mostrando que plantas sexuais de *Brachiaria* possuem menor taxa de polens abortados quando comparadas com seus parentes apomíticos (Ngendahayo, 1988; Dusi, 1999; Alves, 2000). Estudos da viabilidade polínica são extremamente importantes para realizar experimentos de polinização e fertilização controladas. A qualidade do pólen é um fator necessário tanto para o melhoramento tradicional quanto para a utilização da técnica de fertilização in vitro. A viabilidade do pólen varia ao longo do período de floração, influenciada também por fatores ambientais. Em *B. brizantha* sexual (BRA 00274) e apomítica (00591) a viabilidade polínica foi estudada durante o período de floração, de fevereiro a junho, e verificou-se que a taxa de viabilidade é maior e

constante em plantas sexuais, enquanto nas apomíticas a viabilidade é menor e apresenta um pico no mês de abril, auge da floração (Alves, 2000).

Além das condições fisiológicas, as condições físicas e químicas na qual o pólen se encontra desempenham um papel fundamental tanto para o processo de polinização quanto para o sucesso da fertilização *in vivo* e *in vitro*. Para que a fertilização *in vitro* seja bem sucedida, é necessário que o pólen e o explante receptor estejam sobre uma camada horizontal e firme, porém hidratada, uma vez que o processo de germinação é dependente da hidratação moderada do pólen. Essa condição é conseguida pela adição de um agente geleificante ao meio de cultura. A comparação entre agar e Phytigel® evidenciou que a pureza do agente geleificante no meio de cultura não é determinante para o crescimento do tubo polínico em *Brachiaria*. Ahloowalia em 1973 constatou que a fonte de carboidrato no meio era fundamental para a germinação de pólen de centeio, que também é uma gramínea. A análise dos resultados sugere que pelo menos para as espécies de *Brachiaria* estudadas neste trabalho, a concentração de carboidrato é categórica no sucesso da germinação e alongamento do tubo polínico. A condição de 33% de sacarose como fonte de carboidrato foi escolhida para a continuidade dos experimentos uma vez que a maior taxa de germinação e crescimento de tubos polínicos ocorreu nesta concentração ou em torno dela.

Nos experimentos de polinização *in vitro*, onde os polens foram semeados na base de ovários seccionados, evitando várias barreiras físicas e químicas presente ao longo do estigma, estilete e ovário, vários tubos polínicos aderem à base, mas apenas um foi visualizado penetrando o canal micropilar. Essa tendência de apenas um tubo polínico penetrar a micrópila parece ser um

mecanismo importante na prevenção da polispermia e da fertilização da oosfera e da célula central por núcleos espermáticos originados de tubos polínicos diferentes; fenômeno conhecido por heterospermia (Weterings & Russel, 2004). Nos resultados obtidos com a polinização in vitro de *Brachiaria*, destaca-se a penetração e a descarga de núcleo vegetativo e dos espermáticos em sacos embrionários apospóricos. A presença de núcleos dentro da sinérgide degenerada de *B. decumbens* foi também observada em *B. brizantha* cv. Marandu (Alves, 2000). Higashiyama e colaboradores (2003) sugerem que a sinérgide degenerada reduz a resistência durante a entrada do tubo polínico e a mistura de citoplasma do tubo polínico com o citoplasma da sinérgide gera uma “corrente” citoplasmática que carrega uma célula espermática para a oosfera e a outra para a célula central. De fato, neste trabalho, a análise da expressão in situ de *BbrizMYO* sugere sua participação no processo de fertilização, participando provavelmente, no processo de degeneração de sinérgides, por meio de um decréscimo na produção do transcrito e degradação de seus produtos pelo cálcio. A presença de núcleos espermáticos dentro de oosferas não reduzidas é um evento que não foi anteriormente descrito para *Brachiaria*. As avaliações destes eventos pontuais, e raros de se observar in vivo, demonstram a importância do estabelecimento deste sistema in vitro.

O desenvolvimento autônomo do embrião antes da fertilização foi relatado em *Brachiaria* (Dusi & Willemse, 1999; Araujo et al., 2000). Savidan em 1989 supôs que a prevenção da entrada do núcleo espermático na oosfera de plantas apomíticas impedindo a fertilização poderia ocorrer devido a barreiras físicas existentes nesta célula. Em *Pennisetum ciliare* esta barreira consiste de

parede celular que cobre a membrana plasmática da oosfera várias horas antes da penetração do gametófito masculino no saco embrionário (Vielle-Calzada et al., 1995). Outra hipótese para justificar a ausência de fertilização na oosfera não-reduzida é a ativação da oosfera antes da fertilização. Esta hipótese é sustentada em espécies nas quais o desenvolvimento autônomo do embrião ocorre antes da polinização como *Poa*, *Pharbitenium*, *Taraxacum* e *Tripsacum* (Nogler, 1984). Em *Brachiaria* foi sugerido que a ausência de fertilização seria devida a uma ativação precoce da oosfera (Dusi, 2001). Nossos resultados revelaram que em ovário de plantas apomíticas de *B. decumbens* e *B. humidicola* polinizados in vitro e mantidos em cultura por dois dias, o núcleo vegetativo é direcionado para a oosfera que já se encontra diferenciada, não permitindo a fertilização, corroborando a hipótese de Dusí em 2001. Com base nos resultados de hibridização in situ com transcritos de *BbrizMAPK* foi discutido neste trabalho um possível papel de *BbrizMAPK* na indução da fase S na oosfera, ativando seu desenvolvimento autônomo para a formação do embrião. Esta ativação possivelmente decorrente de mudanças precoces no ciclo celular da oosfera não-reduzida desfavoreceria a sincronia do ciclo celular entre a oosfera não reduzida e o núcleo espermático impedindo processo de fusão que em gramíneas normalmente ocorre quando os gametas estão em G1 (Weterings & Russel, 2004).

Experimentos de fertilização in vitro permitirão a condução de experimentos para a produção de híbridos  $2n + n$  a partir de oosfera não-reduzida dois e três dias antes da antese, evidenciando que a ativação precoce da oosfera não-reduzida é determinante no desenvolvimento autônomo do embrião.

O estabelecimento de um protocolo de fertilização in vitro inclui a manutenção dos explantes fertilizados por tempo indeterminado em meio de cultura. Entre os meios de cultura testados, com esta finalidade, aquele que apresentou melhores resultados (meio 3), diferentemente dos outros possui GA3. Este regulador de crescimento é provavelmente relacionado aos melhores resultados encontrados. No entanto, a concentração adequada precisa ainda ser estabelecida. Outras composições podem ser testadas uma vez que, foi verificado, em semanas, um processo de deterioração do material biológico.

## 6. Conclusões

O momento atual da pesquisa em plantas vem sendo apontado como a era pós genômica após a conclusão do sequenciamento dos genomas completos de *Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome, 2000) e arroz (Sequencing Project International Rice, 2005). Busca-se elucidar a função de genes envolvidos nos diferentes processos biológicos de modo a compreender o funcionamento de células e tecidos estudando sua expressão em nível de transcrição, tradução e pós-tradução. Para a caracterização da expressão gênica é necessário que os diferentes processos biológicos estejam precisamente descritos.

No caso da apomixia, as plantas naturalmente apomíticas permitem análise das alterações mínimas que as diferenciam das plantas de reprodução sexual. Em espécies de *Brachiaria* foram apontados momentos precoces da formação e diferenciação do gametófito feminino que irão resultar em apomixia, ou seja, clonagem por meio de sementes onde plantas idênticas à planta mãe são produzidas. Para entender os mecanismos moleculares que acionam a reprodução apomítica é essencial identificar os genes envolvidos e analisar sua expressão.

A grande contribuição do presente trabalho foi localizar a expressão gênica relativa a diferentes seqüências de cDNAs em células específicas do gametófito feminino em momentos precisos do desenvolvimento do ovário. Pôde-se assim iniciar o desenho exato da expressão dos genes na formação e diferenciação do gametófito feminino das plantas apomíticas e sexuais dessa espécie. Graças à função predita em banco de dados pôde-se estabelecer associação entre a localização in situ dos transcritos com os fenômenos envolvendo a formação diferenciada de sacos embrionários de plantas

apomíticas. A expressão de *BbrizREC* foi detectada de forma preferencial no meiócito em momento imediatamente anterior à diferenciação de iniciais apospóricas, precursoras dos sacos embrionários apospóricos. Esse resultado indica que o acúmulo de transcritos desta recombinase pode estar associado à morte programada do meiócito e ao aparecimento das células iniciais apospóricas. Em momentos posteriores da diferenciação do gametófito feminino, precursores da fertilização, *BbrizMYO*, *BbrizAQP*, *BbrizMAPK* apresentaram expressão preferencial nas sinérgides. Nós sugerimos a participação de *BbrizMYO* e *BbrizMAPK* no processo de fertilização enquanto *BbrizAQP* participaria na ativação da oosfera. Nas apomíticas pseudogâmicas não ocorre dupla fertilização, como em plantas sexuais, mas, a fertilização da célula central é necessária para formar o endosperma, enquanto o embrião é formado a partir do desenvolvimento autônomo da oosfera. O presente trabalho também contribuiu para o estabelecimento da técnica de fertilização in vitro que permitirá, em condições controladas, avaliar o papel de diferentes genes no decorrer deste processo, e dessa forma, contribuir à melhor compreensão da reprodução em angiospermas.

## 7. Perspectivas

Em plantas apomíticas, o estudo dos mecanismos envolvidos na diferenciação do saco embrionário do tipo *Panicum* e da formação autônoma do embrião pode contribuir para melhor conhecimento do processo reprodutivo como um todo e possibilitar a utilização de genes relacionados à reprodução em programas de biotecnologia. Busca-se detectar os genes que colocam em ação a apomixia. Ele poderá ser usado para trazer esta característica a plantas de interesse e o conhecimento de sua regulação permitirá o controle do modo de reprodução apomítico, liberando a recombinação genética. Dentro desta perspectiva e baseado nos resultados apresentados no presente trabalho as seguintes estratégias de pesquisa podem ser desenvolvidas em curto prazo:

- Estender as seqüências de clones 7, 10 e 29 de modo a favorecer a inferência de suas funções por análise em bancos de dados durante o desenvolvimento de sacos embrionários de *Brachiaria*.
- Amplificar e clonar seqüências completas dos cDNA estudados.
- Comparar a expressão dos genes estudados em outras apomíticas por meio de hibridização in situ.
- Quantificar o padrão de expressão de *BbrizREC*, *BbrizMYO*, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK* em diferentes órgãos por Real Time PCR.
- Isolar promotores de genes de expressão específica em ovário.
- Utilizar estratégia de silenciamento de genes, mutagênese ou RNA interferente, para detectar a função das seqüências estudadas.
- Desenvolver meios de cultura para a manutenção de ovários de *Brachiaria* fertilizados in vitro, visando estudo controlado das etapas envolvidas na

formação e desenvolvimento de sacos embrionários e também de eventos envolvidos na formação da semente.

## 8. Referências bibliográficas

AHLOOWALIA, B. S. Germination in vitro of ryegrass pollen grains. **Euphytica**, v.22, p.575-581, 1973.

ALBERTINI, E.; MARCONI, G.; REALE, L.; BARCACCIA, G.; PORCEDDU, A.; FERRATINI, F.; FALCINELLI, M. SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa Pratensis*. **Plant Physiology**, v.138, p.2185-2199, 2005.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul LTDA. 1994. 1294 p,

ALVES, E. R. **Aspectos da reprodução em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. (Mestrado em Botânica). Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2000. 94 p.

ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAUJO, A. C. G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v.14, n.4, p.207-212, 2001.

ARAUJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F. ; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste Tome**, v.XXIII, n.1-2, p.13-28, 2000.

ARAUJO, A. C. G.; NOBREGA, J. M.; POZZOBON, M. T.; CARNEIRO, V. T. C. Evidence of sexuality in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) artificial tetraploid plants and progeny. **Euphytica**, 2005.

ARNOLD, D. A.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. RecBCD helicase/nuclease. **Nature. Encyclopedia of Life Sciences**, 2001.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in Plants**. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc. 1992. 298 p.

ASKER, S. Progress in apomixis research. **Hereditas**, v.91, p.231-240, 1979.

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. DE-SOUZA, M. T. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília. 2003. 212 p.

BARRIEU, F.; CHAUMONT, F.; CHRISPEELS, M. J. High expression of the tonoplast aquaporin ZmTIP1 in epidermal and conducting tissues of maize 1. **Plant Physiology**, v.117, p.1153–1163, 1998.

BASHAW, E. C.; HANNA, W. W. **Apomitic reproduction**. Cambridge: Cambridge University Press. 1990. 296 p.

BERTHAUD, J. Apomixis and the management of genetic diversity. In: Y. Savidan, J. G. Carman, *et al* (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 2001. Apomixis and the management of genetic diversity, p.8-23

BICKNELL, R. A.; KOLTUNOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. **The Plant Cell**, v.16, p.S228-S245, 2004.

BIMAL, R.; WILLEMSE, M. T. M. Distribution of Poly (A)<sup>+</sup> containing RNA during female gametophyte development in *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. **Phytomorphology**, v.46, p.9-17, 1996.

BURRIS, P. A.; ZHANG, Y.; RUSCONI, J. C.; CORBIN, V. The pore-forming and cytoplasmic domains of the neurogenic gene product, Big Brain; are conserved between *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster*. **Gene**, v.206, p.69-76, 1998.

CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L. M.; CARNEIRO, V. T. C. Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.101, dezembro 2003, p.1-4, 2003.

CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Biological-Journal-of-the-Linnean-Society**, v.61, n.1, p.51-94, 1997.

CARNEIRO, V. T. C.; CABRAL, G. B.; RODRIGUES, J. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação de plantas apomíticas. In: V. T. C. Carneiro e D. M. A. Dusi (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. Transformação de plantas apomíticas, p.101-112.

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. ORTIZ, J. P. A. Apomixis: occurrence, applications and improvements. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**, v.1, p.564-571, 2006.

CARNEIRO, V. T. C.; MARTINS, G.; BEZERRA, I. C. **Direct development of plantlets from immature panicles of *Brachiaria brizantha* in vitro**. Segundo Encuentro Latinoamericano de biotecnologia vegetal. Puerto Iguazu- Argentina, 1995. A-27 p.

CATANACH, A. S.; ERASMUSON, S. K.; PODIVINSKY, E.; JORDAN, B. R. R., B. Deletion mapping of genetic regions associated with apomixis in *Hieracium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v.Published on line, p.1-6, 2006.

CHAUMONT, F.; BARRIEU, F.; WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M. J.; JUNG, R. Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1206-1215, 2001.

CHEN, L.; GUAN, L.; SEO, M.; HOFFMANN, F.; ADACHI, T. Developmental expression of ASG-1 during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). **Journal of Plant Physiology** v.162 p.1141—1148, 2005.

CHRISPEELS, M. J.; MAUREL, C. Aquaporins: The Molecular Basis of facilitated water movement through living plant cells? **Plant Physiology**, v.105, p.9-13, 1994.

CHRISPEELS, M. J.; CRAWFORD, N. M.; SCHROEDER, J. I. Proteins for Transport of Water and Mineral Nutrients across the Membranes of Plant Cells. **The Plant Cell**, v.11, p.661–675, 1999.

CIAVATTA, V. T.; MORILLON, R.; PULLMAN, G. S.; CHRISPEELS, M. J. ; CAIRNEY, J. An aquaglyceroporin is abundantly expressed early in the development of the suspensor and the embryo proper of loblolly pine. **Plant Physiology**, v.127, p.1556–1567, 2001.

CRANE, C. F. Classification of apomictic mechanisms. In: Y. Savidan, J. G. Carman, *et al* (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 2001. Classification of apomictic mechanisms, p.24-43

CZAPIK, R. How to detect apomixis in Angiospermae. **Polish Bot Stud**, v.8, p.13-21, 1994.

DE LOZANNE, A.; SPUDICH, J. A. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. **Science**, v.236 p.1086 (6), 1987.

DECROOCQ-FERRANT, V.; VAN WENT, J.; BIANCHI, M. W.; DE VRIES, S. C. KREIS, M. *Petunia hybrida* homologues of shaggy/zeste-white 3 expressed in female and male reproductive organs. **Plant Journal**, v.7, p.897-911, 1995.

DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Activity and localization of sucrose synthase and invertase in ovules of sexual and apomictic *Brachiaria decumbens*. **Protoplasma**, v.208, p.173-185, 1999.

DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.41, p.151-162, 1999.

DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.** (PhD thesis). University of Wageningen, Wageningen, 2001.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research** v.8, p.175-185 1998.

FISHER, M. J. KERRIDGE, P. C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: J. W. Miles, B. L. Maass, *et al* (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia, Campo Grande-Brasil: CIAT-Embrapa, v.1, 1996. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species, p.288p

FRIEDMAN, W. E. Embriological evidence for developmental lability during early angiosperm evolution. **Nature**, v.441, p.337-340, 2006.

FU, Y.; YUAN, M.; HUANG, B. Q.; YANG, H. Y.; ZEE, S. Y.; O'BRIEN, T. P. Changes in actin organization in the living egg apparatus of *Torenia fournieri* during fertilization. **Sexual Plant Reproduction**, v.12, p.315-322, 2000.

GOBBE, J.; SWENNE, A. LOUANT, B.-P. Diploides naturels et autotetraploides induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard: criteres d'identification. **Agron Top**, v.36, p.339-346, 1981.

GOLDENBERG, R. WERPACHOWSKI, J. S. Estudo comparativo da ocorrência de apomixia em Melastomataceae e asteraceae. In: V. T. C. Carneiro e D. M.

A. Dusi (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v.único, 2004. Estudo comparativo da ocorrência de apomixia em Melastomataceae e asteraceae, p.19-34.

GORDON, D.; ABAJIAN, C. P, G. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research** v.8, p.195-202, 1998.

GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; ESPINOSA, E.; PEROTTI, E.; GONZALES DE LEON, D. ; SAVIDAN, Y. Non-Mendelian transmission of apomixis in maize-Tripsacum hybrids caused by a transmission ratio distortion. **Heredity**, v.80, p.40-47, 1998.

GRIMANELLI, D.; LEBLANC, O.; PEROTTI, E.; GROSSNIKLAUS, U. Developmental genetics of gametophytic apomixis. **TRENDS in Genetics**, v.17, n.10, p.597-604, 2001.

GROSSNIKLAUS, U.; SCHNEITZ, K. The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. **Cell & Developmental Biology**, v.9, p.227-238, 1998.

GROSSNIKLAUS, U. From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. In: Y. Savidan, J. G. Carman, *et al* (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 2001. p.168-211.

GROSSNIKLAUS, U.; SPILLANE, C.; PAGE, D. R.; KOHLER, C. Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.21-27, 2001.

GUERIN, J.; ROSSEL, J. B.; ROBERT, S.; TSUCHIYA, T.; KOLTUNOW, A. A DEFICIENS homologue is down-regulated during apomictic initiation in ovules of *Hieracium*. **Planta**, v.210, p.914-920, 2000.

HAKMAN, I.; OLIVIUSSON, P. High expression of putative aquaporin genes in cells with transporting and nutritive functions during seed development in Norway spruce (*Picea abies*). **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.369, p.639-649, 2002.

HANNA, W. W.; BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, v.27, p.1136-1139, 1987.

HEBERLE-BORS, E. Cyclin-dependent protein kinases, mitogen-activated protein kinases and the plant cell cycle. **Current Science**, v.80, p.225-232, 2001.

HERR, J. M. J. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms. **American Journal of Botany**, v.58, n.8, p.785-790, 1971.

HERSKOWITZ, I. MAP Kinase Pathways in Yeast: For Mating and More. **Cell**, v.80, p.187-197, 1995.

HIGASHIYAMA, T. The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. **Journal of Plant Research**, v.115, n.1118, p.149-160, 2002.

HIGASHIYAMA, T.; KUROIWA, H.; KUROIWA, T. Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.1, p.36-41, 2003.

JENSEN, W. A.; FISHER, D. B. Cotton embryogenesis: entrance and discharge of the pollen tube in the embryo sac. **Planta (Berl.)**, v.78, p.158-183, 1968.

JONAK, C.; PÁY, A.; BÖGRE, L.; HIRT, H.; HEBERLE-BORS, E. The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ-specific manner. **The Plant Journal**, v.3, n.4, p.611-617, 1993.

KAPIL, R. N.; BHATNAGAR, A. K. A fresh look at the process of double fertilization in angiosperms. **Phytomorphology**, v.silver jubilee, p.334-368, 1975.

KASAHARA, R. D.; PORTEREIKO, M.; SANDAKLIE-NIKOLOVA, L.; RABIGER, D.; DREWS, G. MYB98 Is Required for Pollen Tube Guidance and Synergid Cell Differentiation in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.17, p 2981-2992, 2005.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, v.5, p.1425-1437, 1993.

KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R. A.; CHAUDHURY, A. M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, v.108, p.1345-1352, 1995.

KOLTUNOW, A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p.547-574, 2003.

KOSCINSKA-PAJAK, M.; BEDNARA, J. Unusual microtubular cytoskeleton of apomictic embryo sac of *Chondrilla juncea* L. **Protoplasma** v.227, p.87-93, 2006.

LEBLANC, O.; BERTHAUD, J.; SAVIDAN, Y. Apomixis expression in polyhaploids from maize x *Tripsacum* hybrids. **Apomixis NewsLetter**, v.7, p.26-27, 1994.

LENTINI, Z.; CARNEIRO, V. T. C.; MANZANO, S. J. L. GALINDO, L. **Processo de Regeneração de Plantas e Transformação Genética de espécies de *Brachiaria***. Brasil: CIAT-Colômbia, Embrapa-Brasil. PI 9903700-9 1999.

LEVY, A. A. FELDMAN, M. The impact of polyploidy on grass genome evolution. **Plant Physiology**, v.130, p.1587-1593, 2002.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. ; DARNELL, J. E. **Molecular Cell Biology**. New York: W.H. Freeman and Company. 2001. 1084 p,

LUTTS, S.; NDIKUMANA, J. LOUANT, B. P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomitic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, v.78, p.19-25, 1994.

MANZANO, S. J. L. **Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria* sp, por bombardeamento de partículas**. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 1998. 131 p.

MARANHÃO, A. Q. MORAES, L. M. P. D. **Técnicas básicas em biologia molecular** Brasília: Editora Universidade de Brasília, v.único. 2003. 212 p,

MÁRTON, M. L.; CORDTS, S.; BROADHVEST, J.; DRESSELHAUS, T. Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus of maize. **Science**, v.307, p.573-576, 2005.

MATZK, F.; PRODANOVIC, S.; BAUMLEIN, H. SCHUBERT, I. The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance. **The Plant Cell**, v.17, p.13-24, 2005.

McGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 32: p.W20-W25. 2004.

MOGENSEN, H. L. Pollen tube-synergid interactions in *Proboscidea louisianica* (Martineaceae). **American Journal of Botany**, v.65, n.9, p.953-964, 1978.

NAUMOVA, T. N. MATZK, F. Differences in the initiation of the zygotic and parthenogenetic pathway in the Salmon line of wheat: ultrastructural studies. **Sexual Plant Reproduction**, v.11, p.121-130, 1998.

NAUMOVA, T. VIELLE-CALZADA, J. P. Ultrastructural analysis of apomictic development. In: Y. Savidan, J. G. Carman, *et al* (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. Mexico-DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 2001.

NAUMOVA, T.; DEN NIJS, A. P. M.; WILLEMSE, M. T. M. Quantitative analysis of aposporous parthenogenesis in *Poa pratensis* genotypes. **Acta Botanica Neerl.**, v.42, n.3, p.299-312, 1993.

NDIKUMANA, M. **Étude de l'hybridation entre espèces apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria***. (These de Doctorat). Phytotecnie tropicale et subtropicale, Université Catholique de Louvain, Louvain-Belgium, 1985. 210 p.

NGENDAHOYO, M. **Mechanismes de la reproduction dans le genre *Brachiaria***. (Doctor thesis). Phytotechnie tropicale et subtropicale, Université Catholique de Louvain, Louvain-Belgium, 1988. 82 pp p.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: B. M. Johri (Ed.). **Embriology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. Gametophytic apomixis, p.475-518

NUNES, S. G. ***Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, v.21. 1984. 31 p, (Documentos)

OSBORN, T. C.; PIRES, J. C.; BIRCHLER, J. A.; AUGER, D. L.; CHEN, Z. J.; LEE, H.-S.; COMAI, L.; MADLUNG, A.; DOERGE, R. W.; COLOT, V. MARTIENSSEN, R. A. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in Genetics** v.19, n.3, p.141-147, 2003.

OZIAS-AKINS, P.;LUBBERS, E. L.;HANNA, W. W. MENAY, J. W. Transmition of the apomitic mode of reproduction in *Pennisetum* : co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.632-638, 1993.

OZIAS-AKINS, P.;ROCHE, D. HANNA, W. W. Tight clustering and hemizyosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.95, p.5127-5132, 1998.

PESSINO, S. C.; EVANS, C.; ORTIZ, J. P. A.; ARMSTEAD, I.; VALLE, C. B. HAYWARD, M. D. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of the two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, v.128, p.153-158, 1998.

PESSINO, S. C.; ORTIZ, J. P. A.; LEBLANC, O.; VALLE, C. B. do.; EVANS, C. HAYWARD, M. D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, n.3-4, p.439-444, 1997.

PINHEIRO, A. A.; POZZOBON, M. T.; VALLE, C. B.; PENTEADO, M. I. O.; CARNEIRO, V. T. C. Duplication of the chromossome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants, using colchicine. **Plant Cell Reports**, v.19, n.3, p.274-278, 2000.

POLAQUINI, L. E. M.; SOUZA, J. G.; GEBARA, J. J. Transformações técnico-produtivas e comerciais na pecuária de corte brasileira a partir da década de 90. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.321-327, 2006.

POZZOBON, M. T.; PEREIRA, R. F. A.; PINHEIRO, A. A.; ARAUJO, A. C. G.; CARNEIRO, V. T. C. Meiotic behavior in induced autotetraploids plants of *Brachiaria brizantha*. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p.107, 1999.

QUARIN, C. L.; HANNA, W. W. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. **Crop Science**, v.20, p.69-75, 1980.

QUARIN, C. L.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E. J.; PESSINO, S. C. ; BOVO, O. A. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, v.13, n.5, p.243-249, 2001.

QUARIN, C. L.; NORRMANN, G. A.; ESPINOZA, F. Evidence for autopoloidy in apomictic *Paspalum rufum*. **Hereditas**, v.129, p.119-124, 1998.

RAGHAVAN, V. Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa*). **American Journal of Botany**, v.75, n.2, p.183-196, 1988.

RAGHAVAN, V. **Molecular embryology of flowering plants**. Cambridge: Cambridge University Press. 1997. 690 p,

RAVEN, P. H.; EVERT, R.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, v.único. 1992. 728 p,

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: J. W. Miles, B. L. Maass, *et al* (Ed.). **Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement**. Cali, Colombia Campo Grande, Brasil: CIAT-EMBRAPA, 1996., p.1-15

RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D. CARNEIRO, V. T. C. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, v.53, 2004, p.745-757, 2003.

RODRIGUES-OTUBO, B.; PENTEADO, M. I. D. O.; VALLE, C. B. do. Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria* spp. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.61, n.3, p.175-182, 2000.

RUSSEL, S. D. Double fertilization. In: S. D. Russel e C. Dumas (Ed.). **Sexual reproduction in flowering plants**: Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanicch, Publishers. USA, v.140, 1992. Double fertilization, p.357

RUSSEL, S. The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. **The Plant Cell**, v.5, p.1349-1359, 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning - a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 2 and 3 2001

SANTANA, C. G. **Otimização do método de embriogênese somática de *Brachiaria brizantha* visando maior eficiência de transformação via biobalística** (Monografia de conclusão de curso para obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas). Faculdade da Terra, Brasília, DF, 2006. 39p.

SAVIDAN, Y. Another working hypothesis for the control of parthenogenesis in *Panicum*. **Apomixis Newsletter**, v.1, p.47-51, 1989.

SAVIDAN, Y. Apomixis: Genetics and Breeding. **Plant Breeding Reviews**, v.18, p.13-86, 2000.

SAVIDAN, Y. Transfer of apomixis through wide crosses. In: Y. Savidan, J. G. Carman, *et al* (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 2001. Transfer of apomixis through wide crosses, p.153-166

SCHRANK, A.; FERREIRA, H. B.; SCHRANK, I. S.; REGNER, L. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; ROSSETTI, M. L. R.; RAUPP, R. M.; SILVA.S.C.; GAIESKY, V. L. V. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto. 1996. p 336

SEIFFERT, N. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPQC. 1980. 1 p, (Circular Técnica)

SEQUENCING PROJECT INTERNATIONAL RICE, G. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, n.7052, p.793-800, 2005.

SHERWOOD, R. T. Genetic analysis of apomixis. In: Y. Savidan, J. G. Carman, *et al* (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. Mexico, DF: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR), 2001. Genetic analysis of apomixis

SHERWOOD, R. T.; BERG, C. C.; YOUNG, B. A. Inheritance of apospory in buffleggrass. **Crop Science**, v.34, p.1490-1494, 1994.

SHIMMEN, T ; YOKOTA, E. Cytoplasmic streaming in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, p.68-72, 2004.

SILVEIRA, E. D. CARNEIRO, V. T. C. Análise da expressão de genes associados à apomixia. In: Carneiro, V.T.C; Dusi, D.M.A (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília-DF, 2003, pp 113-126.

SILVEIRA, E. D. **Identificação de cDNAs associados à apomixia em *Brachiaria brizantha* e avaliação da eficiência de promotores exógenos para análises de função**. (Mestrado). Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004. 70 p.

SOLOMON, F. What myosin might do. **Science**, v.236 p.1043 (2), 1987.

SWANSON, C. P.; MERZ, T.; YOUNG, W. J. **Citogenética**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1969. 255 p

THE ARABIDOPSIS GENOME, I. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v.408, n.6814, p.796-815, 2000.

TILTON, V. R. Ovule development in *Ornithogalum Caudatum* (Liliaceae) with a review of selected papers on angiosperm reproduction. IV. Egg Apparatus structure and Function. **The New Phytologist**, v.88, p.505-531, 1981.

TOHME, J.; PALACIOS, N.; LENIS, S.; ROCA, W. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: J. W. Miles, B. L. Maass, *et al* (Ed.). **Brachiaria: Biology, agronomy and improvement**. Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA, 1996, p.196-204

TOMINAGA, Y.; SHIMMEN, T.; TAZAWA, M. Control of cytoplasmic streaming by extracellular  $Ca^{+2}$  in permeabilized *Nitella* Cells. . **Protoplasma**, v.116, p.75-77, 1983.

TUCKER, M. R.; ARAÚJO, A. C. G.; PAECH, N.; HECHT, V.; SCHMIDT, E. D. L.; ROSSEL, J.-B.; DE VRIES, S. C. ; KOLTUNOW, A. M. G. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **Plant Cell**, v.15, p.1524-1537, 2003.

VALLE, C. B. do. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias. In: V. T. E. A. Paulino (Ed.). **Encontro para discussão sobre espécies do gênero Brachiaria**. Nova Odessa, v.2, 1991. p.301-342

VALLE, C. B. do.; GLIENKE, C. ; LEGUISAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, v.7, p.42-43, 1994.

VALLE, C. B. do. ; MILES, J. W. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: A. M. Peixoto, J. C. D. Moura, *et al* (Ed.). **XI Simpósio sobre manejo de pastagem**. Piracicaba, SP, Brasil.: FEALQ, v.23, 1994. p.1

VALLE, C. B. do. ; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: J. W. Miles, B. L. Maass, *et al* (Ed.). **Brachiaria: Biology, agronomy and improvement**. Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA, 1996, p.288

VALLE, C. B. do. **Cytology, mode of reproduction and forage quality of selected species of *Brachiaria* Griseb.** Agronomy, Illinois, Illinois, Urbana, EUA, 1986.

VALLE, C. B. do.; BONATO, A. L. V.; PAGLIARINI, S.; RESENDE, R. M. S. ; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: V. T. C. Carneiro e D. M. A. Dusi (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia.** Brasília - DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, p.47-65

VALLE, C. B. do.; MILES, J. W. Breeding of apomictic species. **Apomixis Newsletter**, v.5, n. Special Issue, p.37-47, 1992.

VAN DIJK, P. J.; VAN BAARLEN, P.; JONG, J. H. D. The occurrence of phenotypically complementary apomixis-recombinants in crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*). **Sexual Plant Reproduction** v.16, p.71 –76, 2003.

VAN WENT, J. L. The ultrastructure of the synergids of *Petunia*. **Acta Botanica Neerlandica**, v.19, p.121-132, 1970.

VAN WENT, J. L. WILLEMSE, M. T. M. Fertilization. In: B. M. Johri (Ed.). **Embryology of Angiosperms:** Springer Verlag, 1984. Fertilization, p.274

VIELLE-CALZADA, J.-P.; BURSON, B. L.; BASHAW, E. C.; HUSSEY, M. A. Early fertilisation events in the sexual and aposporous egg apparatus of *Pennisetum ciliare* (L.) Link. **The Plant Journal** v.8, p.309-316, 1995.

VIELLE-CALZADA, J.-P.;NUCCIO, M. L.;BUDIMAN, M. A.;THOMAS, T. L.;BURSON, B. L.;HUSSEY, M. A. WING, R. A. Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliari* (L.) Link. **Plant Molecular Biology**, v.32, p.1085-1092, 1996.

WETERINGS, K.; RUSSEL, S. D. Experimental analysis of the fertilization process. **The Plant Cell**, v.16, p.107-118, 2004.

WOLF, D. P. The cortical response in *Xenopus Laevis* Ova. **Developmental Biology**, v.40, p.102-115, 1974.

[www.abrasem.com.br/materia\\_tecnica/2004/0008\\_parceria\\_embrapa\\_unipastos.htm](http://www.abrasem.com.br/materia_tecnica/2004/0008_parceria_embrapa_unipastos.htm)

[www.fao.org](http://www.fao.org)

[www.phrap.org](http://www.phrap.org)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi)

YANOCHKO, G. M.; YOOL, A. J. Regulated cationic channel function in *Xenopus* Oocytes expressing *Drosophila* Big Brain. **The Journal of Neuroscience**, v.22, n.7, p.2530–2540, 2002.

YOKOTA, E.; MUTO, S.; SHIMMEN, T. Inhibitory regulation of higher plant myosin by  $Ca^{+2}$  ions. **Plant Physiology**, v.119, p.231–239, 1999.

YUMURA, S.; MORI, H.; FUKUI, Y. Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. **The Journal of Cell Biology** v.99, p.894-899, 1984.

## Legendas das figuras 09; 11; 13; 15; 16; 17; 18; 22; 27 e 28.

**Figura 9:** Representação esquemática da expressão dos clones 07, 10 e 29 durante o desenvolvimento do óvulo de *B. brizantha* sexual (SEX) e apomítica (APO) estão representadas em A, B e C respectivamente.

**A-** Em SEX, a presença do transcrito 07 foi detectada, com intensidade similar, no nucele de óvulos com coenócito, saco embrionário jovem e maduro. Nas células do saco embrionário, sinal de hibridização foi notado apenas nas células do saco em maduro. Em APO, o transcrito foi detectado nas células do nucele ao longo do desenvolvimento. Porém, a intensidade do sinal foi menor nos óvulos contendo a célula-mãe do megásporo e meiócito. Sinal mais intenso foi detectado no citoplasma das iniciais apospóricas, enquanto nos coenócitos houve um decréscimo de hibridização, nos sacos embrionários jovens e nos maduros o transcrito não foi detectado.

**B-** Em SEX, a presença do transcrito 10 não foi detectada sob as nossas condições experimentais. Em APO, fraco sinal de hibridização foi detectado no nucele e célula-mãe do megásporo durante a megasporogênese, enquanto um foi sinal foi observado na base das sinérgides de sacos embrionários maduros.

**C-** Em SEX, a presença do transcrito 29 não foi detectado em óvulos contendo célula-mãe do megásporo ou meiócito. O transcrito foi detectado de forma discreta no nucele de óvulos contendo coenócito e saco embrionário maduro. Enquanto o transcrito não foi observado no saco embrionário em estágio cenocítico, todas as células do saco embrionário maduro apresentaram sinal de hibridização. Em APO, o transcrito foi detectado nas células do nucele durante o desenvolvimento, porém, sinal mais intenso foi observado nos óvulos contendo coenócitos. Um forte sinal de hibridização foi detectado no meiócito, coenócito e células do saco embrionário maduro.

**Figura 11:** Ovários de *Brachiaria brizantha* apomítica hibridizados com a sonda 07. **a-** ovário (OV) com célula mãe do megásporo (MMC) circundada pelo tecido nucelar (N) do óvulo. A presença do transcrito foi detectada igualmente distribuída em todos os tecidos; barra=7,1  $\mu\text{m}$ . **b-** intenso sinal de hibridização foi detectado no meiócito (MC) circundado por células nucleares (N) que também apresentaram sinais de hibridização, ao passo que nas células do ovário (OV) nenhum sinal foi detectado além da coloração de fundo; barra=6,3  $\mu\text{m}$ . **c-** detecção de sinal de hibridização no nucele

(N) e iniciais apospóricas (AI), mas ausente na tétrade (TD) de megásporo; barra=4,9  $\mu\text{m}$ . **d**- Ovário com marcação no coenócito (CO), nucelo (N) e tegumentos (T); barra=8,3  $\mu\text{m}$ . **e**- nenhum sinal de hibridização foi detectado em saco embrionário (ES) jovem, início da celularização, mas a presença do transcrito foi detectada nas células do nucelo (N) e nos tegumentos; barra=7,1  $\mu\text{m}$ . **f**- sinal de hibridização não foi detectado ovário (OV) e células do saco embrionário (ES) maduro. Note as sinérgides (SY), localizadas na porção micropilar (MY). A presença do transcrito foi detectada no nucelo (N); barra=12,5  $\mu\text{m}$ . **g**- outra secção do mesmo ovário apresentado em “f” hibridizado com a sonda senso. Note ausência de hibridização nas sinérgides (SY) e também nas células do nucelo (N); barra=12,5  $\mu\text{m}$ .

**Figura 13:** Expressão do gene representado pelo clone 29 em ovários de planta apomítica (**a-d**) e sexual (**e-h**) de *B. brizantha*. **a**- ovário em megasporogênese, com sinal de hibridização mais fraca ovário (OV) e nucelo (N) e mais forte no meiócito (seta); barra=6,7  $\mu\text{m}$ . **b**- ovário contendo tétrade de megásporo (pontilhado) envolvida pelo tecido nucelar do óvulo; barra= 4,1  $\mu\text{m}$ . **c**- nenhum sinal de hibridização foi detectado no ovário (OV). Óvulo, com tecido nucelar (N) e tegumentos e coenócito (seta) fortemente marcados; barra= 20,8  $\mu\text{m}$ . **d**- ovário contendo saco embrionário maduro com marcação nas sinérgides (SY), na oosfera (EG) e nas células nucleares (N); barra= 6,9  $\mu\text{m}$ . **e**- nenhum sinal de hibridização foi observada em ovário contendo meiócito (seta); barra= 9,3  $\mu\text{m}$ . **f**- ovário contendo coenócito (CO) sem sinal de hibridização, envolvido pelo tecido nucelar que apresenta marcação; barra= 22,2  $\mu\text{m}$ . **g**- ovário (OV) com saco embrionário (ES) do tipo Polygonum, apresentando marcação nas antípodas (A), no aparato da oosfera (seta) localizado na porção micropilar (MY) e também nas células nucleares (N); barra= 10,3  $\mu\text{m}$ . **h**- ovário (OV), incubado com a sonda senso. Antípodas (A) podem ser visualizadas na calaza e o aparato da oosfera (seta) na porção micropilar (MY). Reação de coloração ausente; barra= 10,3 $\mu\text{m}$ .

**Figura 15:** Localização da expressão de *BbrizMYO* por hibridização in situ em secções semi-finas de óvulos de *Brachiaria brizantha* apomítica (**a-h**) e sexual (**i-m**). **a**- secção corada com laranja de acridina, mostrando óvulo com meiócito (MC) circundado por nucelo (N); barra=4,5  $\mu\text{m}$ . **b**- Nenhum sinal de hibridização foi observado na célula-mãe do megásporo (MMC) ou no nucelo (N); barra=4,6  $\mu\text{m}$ . **c**- mesmo óvulo mostrado em **a**, fraco sinal de hibridização pode ser observado na célula-mãe do megásporo (MMC) e nucelo (N); barra=6,0  $\mu\text{m}$ . **d**- inicial apospórica (AI) circundada por nucelo (N)

apresentando um sinal muito fraco; barra=4,7  $\mu\text{m}$ . **e-** coenócito (CO) apospórico, sem sinal de hibridização, próximo a uma inicial apospórica (AI), circundados pelo nucelo (N) mostrando um sinal de hibridização muito fraco; barra=5,3  $\mu\text{m}$ . **f-** pólo micropilar de um óvulo com saco embrionário apospórico jovem mostrando uma sinérgide (SY) sem marcação, a oosfera (EC) e parte do núcleo polar (PN) fortemente marcados; barra=3,6  $\mu\text{m}$ . **g-** saco embrionário apospórico hibridizados com a sonda anti-senso indicando a região micropilar (MY), com marcação no nucelo (N) enquanto na célula central (CC) e sinérgide (SY) nenhum sinal foi detectado sob as nossas condições experimentais. barra=7.3  $\mu\text{m}$ . **h-** secção hibridizada com a sonda senso, nenhum sinal foi detectado além da coloração de fundo; barra=6,0  $\mu\text{m}$ . **i-m-** secções de óvulos de plantas sexuais. sinal não foi observado **i-** na célula-mãe do megásporo (MMC), barra=3,3  $\mu\text{m}$ ; **j-** no meiócito (MC), ou nucelo (N), barra=5.3  $\mu\text{m}$  e **k-** no coenócito (CO) circundado por nucelo (N), barra=4,7  $\mu\text{m}$ . **l-** óvulo com saco embrionário maduro com marcação no nucelo (N), antípodas (A) e aparato da oosfera (EA); barra=6,0  $\mu\text{m}$ . **m-** visão detalhada da região micropilar da mesma secção mostrada em **l**, com marcação no nucelo (N) e em uma das sinérgides (SY\*). Na outra sinérgide (SY), aparato filiforme (FA) e *embellum* (EM) nenhum sinal foi detectado; barra=6,0  $\mu\text{m}$ .

**Figura 16:** Localização da expressão de *BbrizAQP* por hibridização in situ em secções semi-finas de óvulos de *Brachiaria brizantha* apomítica (**a-d**) e sexual (**e-f**) de *Brachiaria brizantha*. **a-** díades (D), que serão degeneradas circundadas pelo nucelo (N); barra=6.2 $\mu\text{m}$ . **b-** óvulo com saco embrionário (ES) apospórico maduro, mostrando forte sinal na oosfera (EG), sinérgides (SY), célula central (CC), núcleo polar (PN) e tegumentos (IN) próximo à micrópila. A parede do ovário (OW) não apresentou sinal além do sinal de fundo; barra=9.1 $\mu\text{m}$ . **c-** visão detalhada de outra secção com o aparato da oosfera do mesmo ES ilustrado em **b** mostrando detalhe da hibridização no citoplasma das sinérgides (SY) e oosfera (EG). Note o aparato filiforme (FA) sem sinal de hibridização; barra=2.9 $\mu\text{m}$ . **d-** sonda senso em óvulo de planta apomítica sem marcação, com núcleo polar (PN) e oosfera (EG); barra=7.5 $\mu\text{m}$ . **e-** ovário de planta sexual com díades (D), circundado pelo nucelo (N); nenhum sinal de hibridização foi detectado sob nossas condições experimentais; barra=8.9 $\mu\text{m}$ . **f-** ES meiótico envolvido pelo nucelo (N), com antípodas (A) no pólo oposto ao pólo micropilar (MY) e parede ovariana (OW) sem sinal visível de hibridização; barra=17 $\mu\text{m}$ .

Localização da expressão de *BbrizMAPK* por hibridização in situ em secções semi-finas de óvulos de *Brachiaria brizantha* apomítica (**g,i,k,l,m**) e sexual (**h,j,n**). **g-** hibridização com a sonda senso. Nenhum sinal não foi detectado no meiócito (MC); barra=6,0  $\mu\text{m}$ . óvulo de planta sexual hibridizado com a sonda senso, sem nenhum sinal na célula-mãe do megásporo (MMC) ou nucelo (N); barra=6,7  $\mu\text{m}$ . **j-** óvulo de planta sexual com tétrade de megásporos (TD) envolvido pelo nucelo (N) sem sinal de hibridização; barra=7,2  $\mu\text{m}$ . **k-** região micropilar do óvulo contendo dois sacos embrionários maduros (ES1 e ES2) com sinal em todas as células, incluindo a célula central (CC), oosfera (EC) e ambas as sinérgides (SY) – fortemente marcadas na porção micropilar. O sinal detectado no nucelo foi similar ao observado nas células do saco embrionário; barra=4,4  $\mu\text{m}$ . **l-** região micropilar de óvulo maduro com forte sinal de hibridização confinado às sinérgides (SY), principalmente na região citoplasmática

(seta) próxima ao aparato filiforme (FA), um sinal mais fraco também foi detectado na oosfera (EC); barra=4,2  $\mu\text{m}$ . **m-** embrião autônomo (E) na região micropilar do óvulo, 48 h após fertilização, onde nenhum sinal de hibridização foi observado; barra=15,8  $\mu\text{m}$ . **n-** óvulo de planta contendo saco embrionário com dois núcleos polares (PN) circundados por nucelo (N), sinal de hibridização não foi detectado sob as nossas condições experimentais; barra=10,5  $\mu\text{m}$ .

**Figura 17:** Representação esquemática da expressão de *BbrizREC* durante o desenvolvimento de óvulos de plantas sexuais (SEX) e apomíticas (APO) de *Brachiaria brizantha* e *B. decumbens*. **A-** a detecção de *BbrizREC* em *B. brizantha* SEX foi efêmera restrita às células do saco embrionário octanucleado. O sinal não foi detectado nas células nucelares em nenhum estágio de desenvolvimento. Em *B. brizantha* APO *BbrizREC* foi detectado primeiramente em poucas células do nucelo que circundam a célula-mãe do megásporo e posteriormente, na presença do meiócito e iniciais apospóricas, em todas as células do nucelo. Um forte sinal de hibridização foi observado no meiócito, enquanto nas iniciais apospóricas nenhum sinal de hibridização foi observado. Nos óvulos contendo sacos embrionários o transcrito não foi detectado. **B-** em *B. decumbens* SEX, o transcrito *BbrizREC* foi detectado no nucelo e tegumentos de óvulos contendo meiócito, mas nesta célula nenhum sinal de hibridização foi detectado. Nos óvulos com saco embrionário *BbrizREC* foi detectado no nucelo, nas células do aparato da oosfera e nas antípodas. Em *B. decumbens* APO, o transcrito de *BbrizREC* foi inicialmente detectado no nucelo de óvulos contendo meiócito. Nesta célula, assim como em *B. brizantha* APO um forte sinal de hibridização foi detectado. Nos óvulos contendo sacos embrionários maduros *BbrizREC* foi detectado no aparato da oosfera, nucelo e tegumentos.

**Figura 18:** Localização do transcrito de *BbrizREC* por hibridização em secções semi-finas de óvulos de *Brachiaria brizantha* apomítica (**a-g**) e sexual (**i-m**) e de *B. decumbens* apomítica (**n,o**) e sexual (**p,q**). **a-** nenhum sinal foi detectado acima da coloração de fundo nas hibridizações realizadas com a sonda senso; barra=5,7  $\mu\text{m}$ . **b-** o transcrito não foi observado na célula-mãe do megásporo (MMC) ou tegumentos (I). Um forte sinal foi detectado no nucelo (N), mais especificamente em algumas células (seta) que circundam a MMC; barra=10  $\mu\text{m}$ . **c-** sinal de hibridização foi observado nas células do nucelo (N) e um forte sinal foi detectado no meiócito (seta). Nenhum sinal foi observado nos tegumentos (I); barra=4,3  $\mu\text{m}$ . **d-** outra secção do mesmo óvulo mostrado em **c**, observe que no núcleo (seta) do meiócito o transcrito não foi detectado; barra=3,7  $\mu\text{m}$ . **e-** algumas iniciais apospóricas (AI) delimitadas por células nucelares (N). O transcrito foi detectado nas células nucelares, principalmente na porção micropilar, porém nenhum sinal além da coloração de fundo foi detectado nas iniciais apospóricas; barra= 9,7  $\mu\text{m}$ . **f-** dois sacos embrionários (ES1 e ES2) apospóricos envolvidos pelo nucelo (N). No pólo micropilar do ES2 nota-se algumas células começando o processo de diferenciação. Nesse estágio de desenvolvimento o sinal não foi detectado; barra=5,3  $\mu\text{m}$ . **g-** pólo micropilar de um óvulo contendo ES, do tipo Panicum, maduro. É possível visualizar uma das sinérgides (SY) e oosfera (EG)

localizadas na porção micropilar do óvulo sem nenhum sinal de hibridização; barra=9.5  $\mu\text{m}$ . **h-** o mesmo ES apresentado em **g** corado com laranja de acridina, RNA fluoresce laranja barra=11  $\mu\text{m}$ . Nenhum sinal foi observado nos óvulos das plantas sexuais contendo: **i-** célula-mãe do megásporo (MMC), barra=9.3  $\mu\text{m}$ ; **j-** meiócito (seta), barra=6,7  $\mu\text{m}$  ou **k-** coenócito (CO), barra=6,7  $\mu\text{m}$ ; **l-** nos óvulos contendo ES octanucleado e iniciando o processo de celularização, uma forte marcação foi detectada em todas as células (\*) dos ES. Nenhum sinal foi observado no nucelo (N) ou tegumentos (I); barra=7,5  $\mu\text{m}$ . **m-** óvulo contendo ES meiótico maduro sem marcação no nucelo (N) ou antípodas (A); barra= 7,1  $\mu\text{m}$ . **n-** fraco sinal de hibridização foi detectado no nucelo (N) enquanto no meiócito (seta) o sinal foi notavelmente mais forte. Nos tegumentos (I) o sinal não foi detectado; barra=3,7  $\mu\text{m}$ . **o-** nos óvulos com ES maduros, um forte sinal foi detectado nas células do aparato da oosfera (seta) nucelo (N) e tegumentos (I). Na parede do ovário (OW) nenhum sinal foi detectado; barra=12,7  $\mu\text{m}$ . **p-** ovário de planta sexual contendo meiócito (seta), onde nenhum sinal de hibridização foi detectado. No nucelo (N) e tegumentos (I) o transcrito foi detectado; barra=6,7  $\mu\text{m}$ . **q-** saco embrionário meiótico maduro, circundado pelo tecido nucelar. Sinal de hibridização foi detectado no nucelo (N), nas células do aparato da oosfera (seta) localizado na porção micropilar (MY) do óvulo nas antípodas (A). Na parede do ovário (OW), nenhum sinal de hibridização foi detectado além da coloração de fundo; barra=17,9  $\mu\text{m}$ .

MMC=célula-mãe do megásporo; N= nucelo; AI= iniciais apospóricas; ES= sacos embrionários, OW= parede do ovário, MY= porção micropilar ou micrópila.

**Figura 22:** Germinação de polens e crescimento de tubos polínicos de *Brachiaria decumbens*. **a-** vários tubos polínicos crescendo no estigma, 7 h após a polinização. Apenas um tubo alcança o estilete (seta) neste momento; barra= 26,7  $\mu\text{m}$ . **b-** tubos polínicos penetrando o óvulo pela região micropilar 24 h após a polinização; barra= 26,7  $\mu\text{m}$ . **c-** polens coletados de anteras abertas após 4 h em meio de cultura; barra= 26,7  $\mu\text{m}$ . **d-** polens coletados de anteras maduras que abrem sob luz incandescente após 4 h em meio de cultura; barra= 26,7  $\mu\text{m}$ .

**Figura 27:** Diferentes secções, do mesmo ovário de *Brachiaria decumbens* apomítica polinizado in vitro, mantido em cultura e incluído 2 dias após polinização, coradas com azul astra e safranina e analisadas em microscópio de luz. **a-** saco embrionário apospórico contendo na porção micropilar uma sinérgide intacta (ISY), uma sinérgide degenerada (DSY) e a oosfera (EG) com seu núcleo (\*); barra= 4,2  $\mu\text{m}$ . **b-** saco embrionário apospórico mostrando dois núcleos germinativos (seta) descarregados, uma sinérgide intacta (ISY) e outra degenerada (DSY) barra= 3,4  $\mu\text{m}$ . **c-** saco embrionário apospórico contendo na porção micropilar sinérgide intacta (ISY), sinérgide degenerada (DSY) e oosfera (EG). Resquícios do tubo polínico podem ser visualizados no aparato filiforme (\*) entre as duas sinérgides. A seta indica o núcleo da sinérgide degenerada; barra= 4,2  $\mu\text{m}$ . **d-** resquício do núcleo vegetativo (seta) próximo à oosfera (EG); barra= 3,8  $\mu\text{m}$ .

**Figura 28:** Secções de ovário de *Brachiaria humidicola* apomítica polinizado in vitro, mantido em cultura e incluído 2 dias após polinização, coradas com azul astra e safranina e visualizadas em microscópio de luz. **a-** óvulo contendo três sacos embrionários (ES 1, ES 2 e ES 3). Em ES1 visualiza-se a oosfera (EG) e o núcleo polar (\*), MY=micrópila; barra= 13,0  $\mu\text{m}$ . **b-** secção posterior do mesmo óvulo visualizado em “a”; barra= 12,6  $\mu\text{m}$ . **c-** detalhe da secção anterior à visualizada em “a”, mostrando um dos núcleos germinativos próximo ao nucléolo de um dos núcleos resultantes da primeira divisão nuclear da oosfera (EG) para a formação do embrião autônomo ; barra= 2,0  $\mu\text{m}$ . **d-** detalhe da secção visualizada em “b”, mostrando o segundo núcleo (cabeça de seta) resultante da primeira divisão nuclear na oosfera (EG) para a formação do embrião autônomo; barra= 2,0  $\mu\text{m}$ .