



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

**Análise da expressão de genes do tipo MADS-Box em
plantas de reprodução sexual e apomítica de
*Brachiaria brizantha***

Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular

Aluna: Larissa Arrais Guimarães

Orientadora: Dr^a Vera Tavares de Campos Carneiro

Dedicatória

Dedico esse trabalho especialmente à minha mãe. À sua luta, coragem, força e dedicação na vida serviram de exemplo para mim. Muito obrigada.

Agradecimentos

À Dr^a Vera Tavares de Campos Carneiro, minha orientadora, pela oportunidade que me ofereceu. Pela paciência, dedicação e confiança e pelo incentivo. Serei eternamente grata.

À Dr^a Diva Dusi, minha co-orientadora, pelo perfeccionismo, apoio profissional, conhecimento e dedicação.

À Gláucia Gabral pelo apoio, companhia e carinho e pela disposição em ajudar e ensinar.

À Dr^a Ana Cláudia Guerra pelos ensinamentos, pela ajuda e tentativa de me acalmar.

À Ana Cristina Gomes pelo coração de mãe, que acolhe a todos e pelos ensinamentos.

À Dr^a Adriana Rodriguez pelas lindas fotos de varredura.

Ao Dr. Márcio Alves por me receber no laboratório Biotecnologia Vegetal, na universidade UFRJ, no Rio de Janeiro, e por ceder a máquina de qRT-PCR.

Ao Dr. Marcelo Dornelas por me receber em seu laboratório na Unicamp e pelos ensinamentos em análises filogenéticas.

Ao Dr. Felipe da Silva, pelas análises de bioinformática.

À Rosana Falcão pelo apoio na microscopia.

Ao Dr. Alan Carvalho por permitir utilizar o Phospho Image.

À Dr^a Leila Barros e ao Dr. Mauro Carneiro por ceder os equipamentos do laboratório.

Ao Marco Antonio Valle Agostini pelas análises de RT-PCR.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por ceder espaço e condições de trabalho para o desenvolvimento dessa dissertação

Às minhas amigas apomíticas, Érica Silveira, Ana Luiza Lacerda e Elizângela Alves pela amizade e pelos ensinamentos.

Às minhas amigas que conheci na graduação e que sempre estarão no meu coração, Betúlia, Luisa e Nadinni.

A todos do Laboratório de Transferência de Genes (LTG) pelos reagentes e equipamentos emprestados e pelas dicas fundamentais nos experimentos.

À Andréa Khoeler pela amizade e pela companhia no laboratório.

À plataforma de seqüenciamento da Embrapa Recursos Genéticos e Bioecnologia.

Ao Bruno e ao Rafael pelos muitos e muitos e muitos ovários.

Ao pessoal do laboratório de Reprodução Vegetal pelo interesse em aprender e pela ajuda.

Aos Drs. Bergmann M. Ribeiro, Renato Rezende e Sonia Bao por permitirem a polimerização do material utilizado neste trabalho no laboratório de Biologia Celular na UnB.

À Dr^a Ildinete Pereira, Dr^a Diva Dusi e ao Dr Francisco Aragão pelas opiniões e dicas na qualificação da tese de mestrado.

À Neidinha pela compreensão quando eu chegava nervosa em casa. Pelo feijão do dia-a-dia e pelos muitos brigadeiros enquanto escrevia a dissertação.

À minha mãe e à minha irmã, lindas, pelo amor incondicional. Só vocês para me agüentarem a vida inteira. Amo muito vocês duas.

À minha sobrinha, Malu, pelas caretas, beijinhos, gargalhadas e sorrisos.

À minha vizinha (*in memoriam*). Foi você quem me ensinou a gostar de plantas.

À toda a minha família, especialmente, ao meu avô. Um guerreiro.

À todos os meus amigos e àqueles que torceram por mim.

À Banca examinadora: Dr Francisco Aragão e Dr^a Diva Dusi por aceitarem o convite e por terem contribuído tanto na estruturação da dissertação.

À Ana do departamento de Biologia Celular pela eficiência e atenção.

Ao departamento de Biologia Celular pela oportunidade de cursar o mestrado.

Dedicatória	I
Agradecimentos	II
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
1. Introdução	I
1.1. Apomixia	1
1.1.1. Definição	1
1.1.2. Ocorrência	3
1.1.3. Detecção da apomixia.....	3
1.1.4. Herança genética.....	4
1.1.5. Interesse biotecnológico	5
1.2. Brachiaria	6
1.2.1. Classificação taxonômica	6
1.2.2. Importância econômica.....	6
1.2.3. Modo de Reprodução.....	7
1.2.4. Caracterização do meristema floral de <i>Brachiaria</i>	7
1.3. MADS-Box	8
1.3.1. Definição	8
1.3.2. O modelo ABCDE.....	9
1.3.3. Desenvolvimento floral de angiospermas e o modelo ABC	10
1.3.4. Estudos filogenéticos	12
1.3.5. Genes tipo MADS-Box e a apomixia	13
2. Objetivo	14
3. Material e Métodos	14
3.1. Material Vegetal	14
3.2. Construção de bibliotecas de cDNA de ovários de <i>B. brizantha</i> apomítica em megasporogênese	15
3.2.1. Purificação de RNA poli A+.....	16
3.2.2. Síntese da primeira fita de cDNA.....	17
3.2.3. LD PCR (<i>Long Distance</i> PCR).....	17
3.2.4. Tratamento com Proteinase K	17
3.2.5. Digestão Enzimática	18
3.2.6. Fracionamento dos cDNA's	18
3.2.7. Ligação da biblioteca de cDNA.....	18
3.2.8. Preparo de células competentes <i>E. coli</i> XL1 <i>Blue</i> para eletroporação	18
3.2.9. Transformação das bibliotecas de cDNA em XL1 <i>Blue</i> por eletroporação	19
3.2.10. Anotação de seqüências	19
3.3. Extração de RNA total de ovário e antera de <i>Brachiaria brizantha</i>	20
3.4. Extração de RNA total de folhas e raízes de <i>Brachiaria brizantha</i>	20
3.5. RT-PCR	21
3.6. Minipreparação de DNA plasmidial	22
3.7. Extração de DNA genômico de <i>Brachiaria brizantha</i>	22

3.8. Análise de Restrição do DNA genômico de <i>B. brizantha</i> com enzimas de restrição	23
3.9. Southern-blot.....	23
3.10. Análises filogenéticas	24
3.11. PCR para ampliar o contig 119	24
3.12. Hibridização in situ.....	25
3.12.1. Preparo do material.....	25
3.12.2. Inclusão em BMM	25
3.12.3. Inclusão em parafina.....	26
3.12.4. Teste com laranja de acridina	26
3.12.5. Síntese das sondas marcadas com digoxigenina	26
3.12.6. <i>Dot Blot</i>	28
3.12.7. Reação de hibridização	28
3.12.8. Reação de pós-hibridização e detecção imunológica.....	28
3.13. Reação de qRT-PCR.....	29
3.14. Sequências dos contig 38 e 119 seus domínios conservados e os iniciadores	30
4. Resultados	33
4.1. Construção da biblioteca de cDNA de ovário de <i>Brachiaria brizantha</i> apomítica em megasporogênese.....	33
4.1.1. Extração de RNA total.....	33
4.1.2. Fracionamento de cDNA	33
4.1.3. Análise de seqüências das bibliotecas de cDNA de ovários de <i>Brachiaria brizantha</i> sexual e apomítica.....	34
4.2. Identificação de genes do tipo MADS-Box nas bibliotecas	35
4.3. Reverse Transcriptase - PCR (RT-PCR)	36
4.4. Análise de restrição de DNA genômico e <i>Southern-blot</i>	39
4.5. Ampliação do tamanho da seqüência de cDNA do contig 119.....	40
4.6. Análise de expressão dos contigs 119 e 38 em diferentes órgãos por qRT-PCR.....	42
4.7. Detecção de transcritos dos contigs 119 e 38 em tecidos reprodutivos por hibridização in situ.	45
4.8. Análise filogenética das seqüências dos contig 38 e 119.....	50
5. Discussão	52
6. Conclusão.....	58
7. Perspectivas.....	58
8. Referências Bibliográficas	59

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos da reprodução sexual e apomítica e seus respectivos tipos de sacos embrionários.	2
Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura dos meristemas florais de <i>Brachiaria brizantha</i> apomítica.	8
Figura 3. Organização do órgão floral de dicotiledôneas e o modelo ABCDE.	10
Figura 4. Esquema da organização floral adaptado para <i>Brachiaria</i>, modelo ABC para monocotiledôneas e espiguetas de <i>Brachiaria</i>.	12
Figura 5. Ovários de <i>Brachiaria brizantha</i> nos estágios de megasporogênese e megagametogênese.	15
Figura 6. Mapa do vetor pTriplEx2.	16
Figura 7. Mapa do vetor pGEM[®]-T Easy (Promega[®])	27
Figura 8. Identificação dos domínios conservados e localização dos iniciadores utilizados nos experimentos deste trabalho.	31 e 32
Figura 9. Perfil eletroforético de RNA total de ovário de B30 estágios I e II (megasporogênese).	33
Figura 10. Fracionamento dos cDNAs da biblioteca B30 estágios I e II em coluna CHROMA SPIN-400.	33
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de amplificação por RT-PCR para o contig 38.	36
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de amplificação por RT-PCR para o contig 119.	37
Figura 13. <i>Southern-blot</i> do produto da RT-PCR.	39

Figura 14. Perfil de restrição do DNA genômico de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual.	39
.....	
Figura 15. <i>Southern blot</i> de DNA genômico <i>Brachiaria brizantha</i> apomítica.	40
.....	
Figura 16. Alinhamento das seqüências do contig 119 de m6 de <i>Zea mays</i> e da ampliação do contig 119	41
.....	
Figura 17. Perfil eletroforético de RNA total de diferentes órgãos de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual.	42
.....	
Figura 18. Perfil eletroforético da amplificação por qRT-PCR.	43
.....	
Figura 19. PCR em tempo real (qRT-PCR) monitorando a expressão dos contigs 38 e 119.	44
.....	
Figura 20. Padrão de expressão do gene referente ao contig 38 por hibridização in situ.	46
.....	
Figura 21. Padrão de expressão do gene referente ao contig 119 por hibridização in situ.	48
.....	
Figura 22. Esquema de localização dos transcritos dos genes referentes aos contig 38 e 119 em ovários de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual.	49
.....	
Figura 23. Árvores filogenéticas.	51
.....	

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de clones das bibliotecas de cDNA de ovários nos acessos sexual e apomítico nos estágios de diferenciação do saco embrionário de megasporogênese e megagametogênese analisados em bancos de dados não redundante BLASTX e BLASTN.....	34
Tabela 2. Número de clones seqüenciados das bibliotecas nos acessos sexual e apomítico, nos estágios de diferenciação do saco embrionário de megasporogênese e megagametogênese.	34
Tabela 3. Composição e número dos clusters das bibliotecas dos acessos sexual e apomítico, nos estágios de diferenciação do saco embrionário de megasporogênese e megagametogênese.	35
Tabela 4. Relação dos níveis de expressão do contig 38 no ciclo 28 analisados no programa Zero-Dscan (Scanalytics®) na RT-PCR em ovários de diferentes plantas e em diferentes estágios de desenvolvimento.....	38
Tabela 5. Relação dos níveis de expressão do contig 119 no ciclo 32 analisados no programa Zero-Dscan (Scanalytics®) na RT-PCR em ovários de diferentes plantas e em diferentes estágios de desenvolvimento.	38

Resumo

O gênero *Brachiaria* é composto por apresenta espécies com plantas de modo de reprodução sexual e apomítico. Na reprodução apomítica, o saco embrionário se diferencia de uma célula não reduzida e o desenvolvimento do embrião se dá sem fertilização da oosfera. Genes tipo MADS-Box são fatores de transcrição relacionados com o desenvolvimento de órgãos florais. A caracterização desses genes homeóticos em *Brachiaria brizantha* poderá contribuir para o entendimento da diferenciação dos órgãos reprodutivos nos diferentes tipos de reprodução. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de expressão de genes da família MADS-Box, visando relacionar a atuação destes genes com a sexualidade e a apomixia. Duas seqüências MADS-Box, contigs 38 e 119, foram identificadas em bibliotecas de cDNA de ovários em megasporogênese e megagametogênese de *Brachiaria brizantha* apomítica e sexual. Análises filogenéticas demonstraram que a seqüência de aminoácidos deduzida do contig 38 é próxima a *AGL6* e a do contig 119 de *SEPPALATA 2 (SEP2)* de *Arabidopsis thaliana*. Análises de qRT-PCR e RT-PCR indicaram repressão dos genes referentes a ambos os contigs em ovários em megasporogênese de *B. brizantha* apomítica. Transcritos destes genes foram localizados em ovários, anteras e meristemas florais de plantas apomíticas e sexuais nos diversos estágios. A expressão foi equivalente em plantas apomíticas e sexuais, no caso de *BbrizAGL6*. Os resultados obtidos neste trabalho associados a dados da literatura em outras espécies sugerem o envolvimento dos genes correspondentes aos contigs 38 e 119 na identidade do órgão floral e do meristema de *B. brizantha*. Sugerimos que estes genes sejam nomeados *BbrizAGL6* e *BbrizSEP2*, respectivamente.

Abstract

Brachiaria genus has species containing sexual and apomictic plants. In apomictic reproduction, embryo sac differentiates from an unreduced cell and the embryo develops in absence of egg cell fertilization. MADS-Box genes are transcription factors that are involved in floral organ formation. The characterization of these homeotic genes in *Brachiaria brizantha* can contribute for the understanding of reproductive organs differentiation in apomictic and sexual plants. The objective of the present work was to analyze the MADS-Box genes expression profile, aiming to correlate their activity with apomixis and sexuality. Two MADS-Box sequences, contigs 38 and 119, were identified in cDNA libraries of ovaries in megasporogenesis and megagametogenesis from sexual and apomictic *Brachiaria brizantha*. Phylogenetic analysis showed that the contig 38 deduced aminoacid sequence is close to *AGL6* and contig 119 to *SEPPALATA 2 (SEP2)* from *Arabidopsis thaliana*. qRT-PCR and RT-PCR analysis indicated downregulation of the genes associated to both contigs in ovaries of apomictic *B. brizantha* during megasporogenesis. The transcripts of these genes were localized in ovaries, anthers and floral meristems of apomictic and sexual plants in different stages of development. Their expression was equivalent in apomictic and sexual plants, in case of *BbrizAGL6*. The data obtained at this work compared with results from other plants species reported at the literature suggest that the genes associated to contig 38 e 119 are involved with the identity of floral organs and the meristem of *B. brizantha*. It is suggested that these genes were named *BbrizAGL* e *BbrizSEP*, respectively.

1. Introdução

1.1. Apomixia

1.1.1. Definição

Apomixia é um tipo de reprodução assexual em que o embrião se desenvolve sem que haja fecundação da oosfera. Em alguns casos, por exemplo *Brachiaria*, permanece necessária ainda a fecundação da célula central para formação do endosperma, pseudogamia (Nogler, 1984a). A apomixia pode ser observada em mais de 400 espécies de plantas em mais de 40 famílias - entre elas Poaceae, Asteraceae, Rosaceae e Rutaceae (Hanna et al., 1987, Carman, 1997).

De acordo com Nogler (1984a), apomixia pode ser dividida em três grupos principais: aposporia, diplosporia e embrionia adventícia. As classificações baseiam-se na origem e no desenvolvimento do embrião. Aposporia e diplosporia podem ser agrupadas nos termos apomixia gametofítica ou apomeiose (Nogler, 1984a), pois definem a formação do embrião ou da oosfera não reduzida como resultado da diferenciação de uma célula que não tenha sofrido redução por meiose, que se diferencia em megagametófito. Já na embrionia adventícia (apomixia esporofítica), o embrião se desenvolve diretamente de uma célula somática (Figura 1). Aposporia se caracteriza pela formação do gametófito feminino a partir de uma célula somática, denominada inicial apospórica, de origem nucelar. Diplosporia consiste na formação do gametófito a partir de uma célula reprodutiva que não completou a meiose (Nogler, 1984a; Savidan, 2000b) sendo, portanto não reduzida.

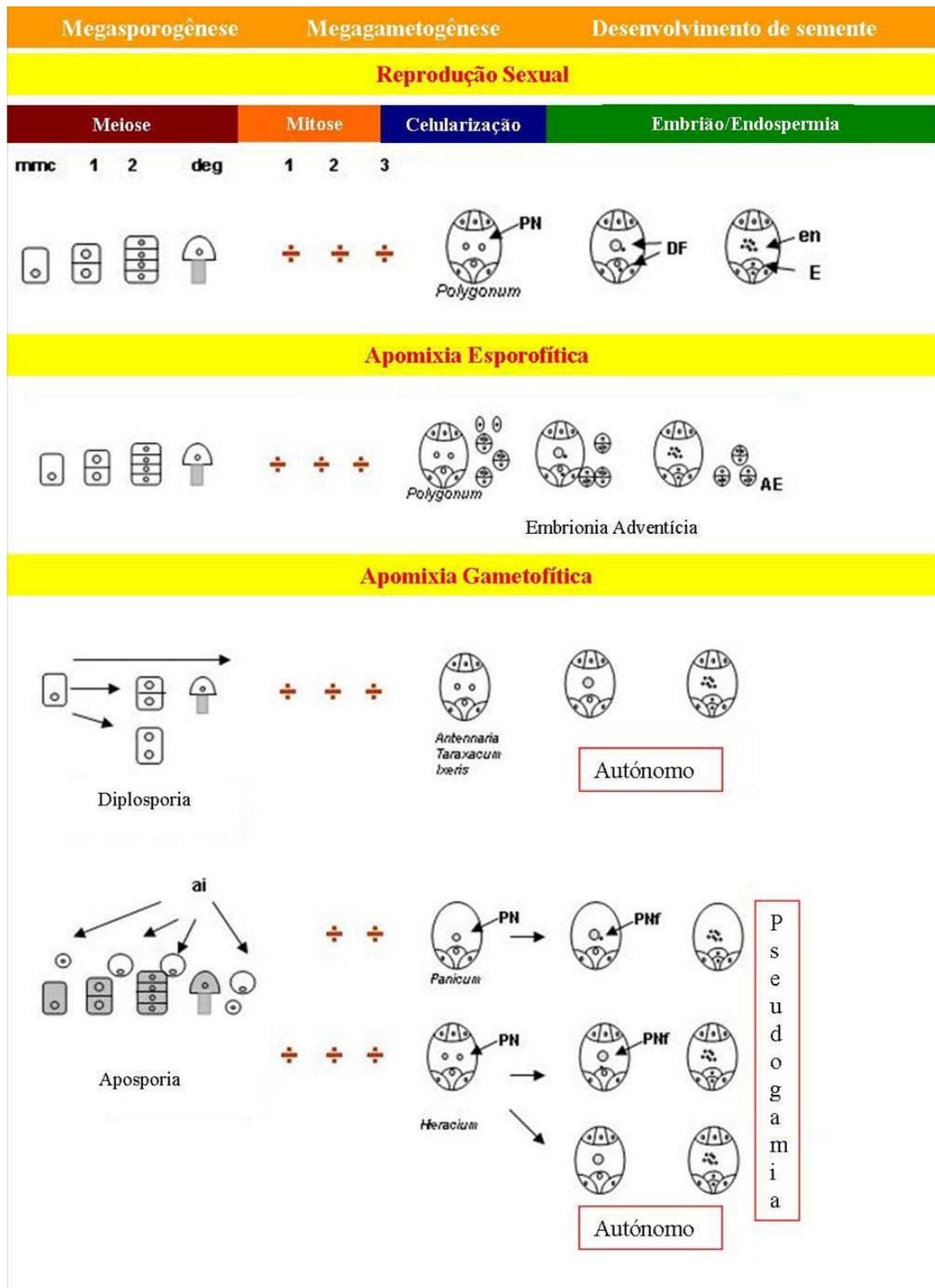


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos da reprodução sexual e apomítica e seus respectivos tipos de sacos embrionários, baseado em Nogler (1984a), Asker and Jerling (1992), Koltunow (1993). ai = iniciais apospóricas; AE= embriões adventícios; DF = dupla fertilização (fertilização da oosfera e do núcleo polar); E= embrião; en = endosperma; PN = núcleo polar; PNf = fertilização do núcleo polar; mmc= célula mãe do megásporo; deg= degeneração da tétrade. As células em cinza indicam que estas podem degenerar naquele estágio do desenvolvimento. (adaptado de Carneiro *et al*, 2006).

1.1.2. Ocorrência

Estudos em apomixia são feitos utilizando monocotiledôneas e dicotiledôneas que apresentam o sistema apomítico para avaliar as características naturais desse modo de reprodução. Representantes de monocotiledôneas apomíticas são encontradas nos gêneros *Panicum* (Savidan, 1980; Chen et al., 1999; Ebina et al., 2005), *Pennisetum* (Gualtieri et al., 2006), *Cenchrus* (Ozias-Akins et al., 2003; Roche et al., 1999; Roche et al., 2002), *Brachiaria* (Pessino et al., 1997,1998; Rodrigues et al., 2003), *Paspalum* (Martinez et al., 2001; Calderini et al., 2006), *Poa* (Naumova et al., 1999; Albertini et al., 2001a; Albertini et al., 2001b; Matzk et al., 2005) e *Tripsacum* (Grimanelli et al., 1998; Sokolov, 1996). Os gêneros *Taraxacum* (van Dijk et al., 2003), *Erigeron* (Noyes, 2004), *Hieracium* (Koltunow et al., 1998; Koltunow et al., 2000), *Hypericum* (Matzk et al., 2001; Matzk et al., 2003) e *Boechera* (Schranz et al., 2006) apresentam espécies de plantas dicotiledôneas apomíticas. *Arabidopsis*, arroz e milho não se reproduzem por apomixia, mas estão sendo utilizados nestes estudos na tentativa de alterar etapas da reprodução, por mutagênese, que tragam características de plantas apomíticas como desenvolvimento autônomo do embrião (Savidan, 2000a; Kaushal, 2004).

1.1.3. Detecção da apomixia

A inferência do modo de reprodução de plantas baseia-se em avaliações morfológicas em testes de progênie, análises de ovários por microscopia, citometria de fluxo e métodos bioquímicos e moleculares. Observações citológicas dos ovários associado à caracterização da variabilidade/uniformidade genética da progênie são necessários para exaurir as informações e determinar o modo de reprodução (Ozias-Akins, 2006; Valle et al., 2004).

Os testes de progênie representam a forma mais simples de detecção. A variabilidade denota recombinação gênica e, portanto, sexualidade; enquanto a uniformidade indica apomixia (Devos, 2005). O fator limitante desta técnica está no número de indivíduos necessários para as análises e no tempo envolvido no ciclo de crescimento de plantas. Além disso, esta técnica desconsidera a apomixia facultativa (Valle et al., 2004).

A técnica citológica exige o estudo das estruturas dos ovários utilizando microscopia de luz, de fase ou de interferência. As análises podem ser feitas por cortes, coloração ou clareamento de ovários. Essa metodologia, no entanto, além de exigir treinamento, é muito laboriosa e inviável no estudo de grandes populações ou coleções

de germoplasma. Essa técnica não é aplicável no caso da diplosporia, devido ao tamanho do material a ser utilizado. Neste caso, a detecção de caracteres morfológicos que diferenciam os modos de reprodução apomítico e sexual deve ser feita nos ovários quando ainda é possível observar a célula-mãe do megásporo (Valle et al., 2004; Ozias-Akins, 2006).

Os testes de progênie e as análises citológicas são procedimentos que exigem um ciclo completo de crescimento. Os marcadores moleculares e bioquímicos que co-segregam com a apomixia apresentam a vantagem da precocidade na determinação do modo de reprodução utilizando como objeto de estudo sementes ou plântulas (Ozias-Akins et al., 1993, Antonius et al., 1995; Ortiz et al., 1997; Leblanc et al., 1995; Pessino et al., 1998; Pessino et al., 1997). Esta técnica, porém, exige ainda definição de protocolos para cada espécie em estudo. Além disso, os custos das análises são elevados. Ainda não se sabe, ao certo, se os marcadores podem ser aplicados em populações diferentes daquelas nas quais foram identificados (Valle et al., 2004).

Outro método, recentemente descrito, que auxilia na determinação do modo de reprodução é a citometria de fluxo em sementes. A comparação relativa do conteúdo de DNA no embrião e no endosperma permite concluir a origem nuclear desses tecidos (Matzk et al., 2000; Krahulcova et al., 2006).

1.1.4. Herança genética

Cruzamentos interespecíficos da geração F₁ de diferentes populações de híbridos (Lutts et al., 1994; Valle et al., 1994; Valle et al., 1996; Miles et al., 1997) demonstraram segregação 1:1 dos caracteres apomixia e sexualidade, sugerindo herança monogênica e dominante da apomixia em *Brachiaria*, assim como em *Panicum* (Savidan, 1983), *Ranunculus* (Nogler, 1984b), *Pennisetum* (Sherwood et al., 1994, Ozias-Akins et al., 1998, Roche et al., 1999), *Hieracium* (Bicknell et al., 2000). Entretanto, em *Poa*, *Erigeron* e *Taraxacum*, a apomixia gametofítica é controlada por mais de um gene em diferentes *loci* (Grossniklaus et al., 2001).

Apomixia gametofítica, por alguma razão, muitas vezes está relacionada com poliploidia (Asker et al., 1992). A relação entre apomixia e poliploidia foi investigada por duplicação de cromossomos e cruzamentos interespecíficos. O efeito da duplicação de cromossomos foi estudada em plantas diplóides que apresentavam reprodução sexual. Em *Paspalum*, o sucesso na manifestação da apomixia após a duplicação foi maior nas plantas que pertenciam a grupos que apresentavam previamente a apomixia

(Quarin et al., 1980; Quarin et al., 1998, Quarin et al., 2001). Em *Brachiaria*, a duplicação de cromossomos de diplóides *B. brizantha* e *B. ruziziensis*, que apresentam poliplóides apomíticos, não foi suficiente para a expressão da apomixia (Gobbe et al., 1981; Pinheiro et al., 2000; Araujo et al., 2005). Essas observações reforçaram a hipótese de uma herança monogênica e dominante da apomixia em *Brachiaria*. O genitor apomítico teria o genótipo Aaaa e o sexual aa. As plantas sexuais tetraploidizadas seriam aaaa (Valle et al., 1994, Valle et al., 2004) e, portanto, não expressariam a apomixia.

1.1.5. Interesse biotecnológico

Existem diferentes perspectivas de aplicação biotecnológica da pesquisa básica em apomixia, que contribuirão à elucidação dos processos envolvidos na formação do megagametófito tanto na reprodução sexual quanto na apomítica. O entendimento do controle genético da apomixia fornecerá ferramentas tanto para o melhoramento genético de plantas apomíticas e viabilizará aplicações biotecnológicas, como listado a seguir:

- fixação de genótipos de interesse em híbridos, variedades adaptadas a ecossistemas muito restritos e genótipos-elite (Rodrigues et al., 2003), gerando redução de custos;
- produção de sementes de híbridos, sem perda de vigor, mantendo combinações de genes que poderiam ser afetadas com a recombinação e segregação provenientes da reprodução sexual e gerando redução de custos de produção (Spillane et al., 2004; Spielman et al., 2003);
- propagação e estoque por sementes de culturas que são propagadas vegetativamente evitando transferência viral (Bicknell et al., 2004)
- produção de inúmeras gerações de sementes de alta qualidade pelo próprio agricultor (Abraham et al., 1963);
- recombinação de novas variedades aumentando a variedade de genes de espécies que se reproduzem preferencialmente por apomixia (Rodrigues *et al.*, 2003), pela quebra da apomixia;
- prevenção do escape de genes de plantas transgênicas e o fluxo gênico (Spielman et al., 2003) pela associação de esterilidade masculina associada a plantas apomíticas.

1.2. *Brachiaria*

A subfamília Panicoideae inclui aproximadamente 208 gêneros reunidos em diversas tribos, entre elas, Paniceae com mais de 110 gêneros (Clayton et al., 1986; Watson et al., 1992). O gênero *Brachiaria*, com o centro de diversidade na África e, portanto, de possível origem africana foi introduzido no Brasil no início do período colonial (Seldulsky, 1978). É composto por aproximadamente 100 espécies (Renvoize et al., 1996) e apresenta colmo herbáceo que floresce uma vez por ano. O período de floração, no Brasil, se inicia nos últimos dias de dezembro e se estende até meados de julho. As inflorescências de *Brachiaria brizantha* possuem racemos do tipo panícula com espiguetas solitárias e unisseriadas. A espiguetas é composta por duas flores: a floreta inferior exclusivamente masculina e a floreta superior hermafrodita. A flor hermafrodita abriga três anteras, um pistilo com apenas um ovário uniovular e duas lodículas. A flor masculina se difere da hermafrodita exclusivamente pela ausência de pistilo (Seldulsky, 1978).

1.2.1. Classificação taxonômica

Divisão: Anthophyta
Subdivisão: Angiospermae
Classe: Monocotyledonae
Ordem: Pales (Glumiflorales)
Família: Poaceae (Gramineae)
Subfamília: Panicoideae
Tribo: Paniceae
Gênero: *Brachiaria*

1.2.2. Importância econômica

A agropecuária é um importante setor da economia brasileira. O maior rebanho bovino comercial do mundo situa-se no Brasil, com 195,6 milhões de cabeças de gado (Karia et al., em prelo) e movimenta em torno de R\$ 12 bilhões por ano (Polaquini et al., 2006). A busca por novas tecnologias e o melhoramento genético das forrageiras são indispensáveis para aumentar a produtividade desse setor no Brasil. A qualidade das forrageiras é essencial para o sucesso da agropecuária, pois, no Brasil, a criação do rebanho bovino se dá principalmente com a utilização de pastagens.

Em 1996, Fisher e Kerridge estimaram aproximadamente 70 milhões de hectares cultivados com braquiária. Esta forrageira apresenta facilidade de adaptação a vários tipos de solos (Fisher et al., 1996) e algumas espécies são resistentes a determinadas pragas como a cigarrinha das pastagens (Miles et al., 1996).

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).

1.2.3. Modo de Reprodução

Esse gênero apresenta espécies com plantas de modo de reprodução sexual e apomítico. As plantas de reprodução sexual apresentam exclusivamente sacos embrionários do tipo Polygonum. Em plantas com a reprodução apomítica, os sacos embrionários são do tipo Panicum, mas também pode ocorrer saco embrionário do tipo Polygonum, que é característico da reprodução sexual, em diferentes proporções (Lutts et al., 1994; Araújo et al., 2000b; Dusi et al., 1999; Miles et al., 1991). Isso é um indicativo de que a apomixia em *Brachiaria* é facultativa (Valle, 1990; Koltunow, 1993). Os sacos embrionários do tipo Panicum possuem quatro núcleos enquanto os do tipo Polygonum possuem oito núcleos (Dusi et al., 1999; Araújo et al., 2000b).

A ploidia em *Brachiaria* apresenta grandes variações, porém as cultivares de maior importância são tetraplóides (cv. Brasilisk e cv. Marandu) ou hexaplóides (*B. humidicola*) (Valle, 1990) e reproduzem-se essencialmente por apomixia (Valle, 1991). Já os diplóides encontrados em *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* são sexuais (Carneiro et al., 2004).

1.2.4. Caracterização do meristema floral de *Brachiaria*

No gênero *Brachiaria*, o desenvolvimento do meristema floral foi descrito, até o momento, somente em *Brachiaria decumbens* (Stur, 1986). Em 2005, Reinheimer e colaboradores descreveram o desenvolvimento das inflorescências, espiguetas e flores de *Panicum maximum* e *Urochloa plantaginea*, que pertencem à mesma família de *Brachiaria*, Poaceae. Baseando-se nas estruturas determinadas e identificadas em *Brachiaria decumbens*, *Panicum maximum* e *Urochloa plantaginea*, foram identificadas as estruturas presentes no desenvolvimento floral de *Brachiaria brizantha* (Figura 2). As espiguetas das inflorescências são compostas de glumas superiores e inferiores que

circundam as floretas masculinas e hermafroditas. Cada floreta possui lema, pálea e três estames. No centro da flor hermafrodita, desenvolve-se o gineceu.

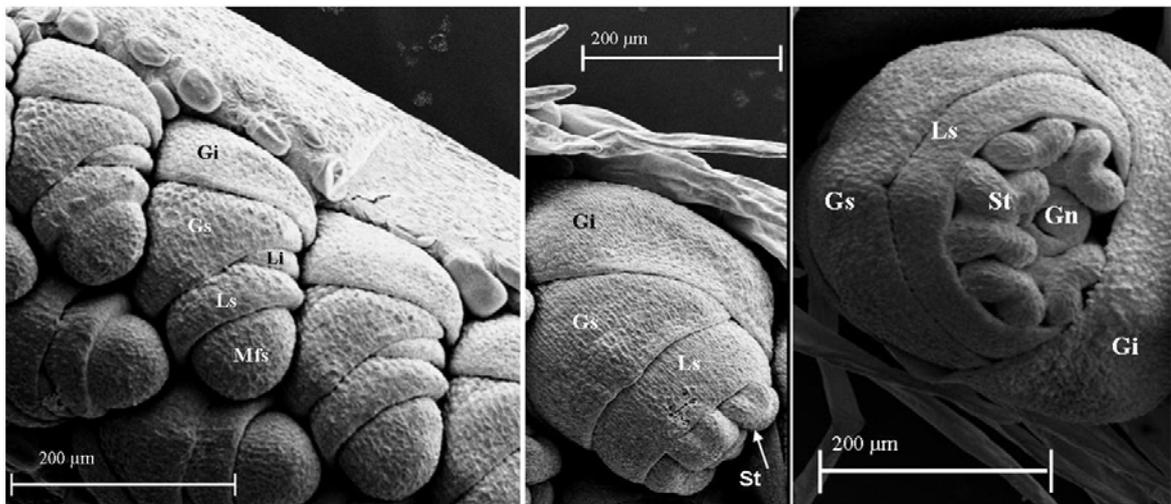


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura dos meristemas florais de *Brachiaria brizantha* apomítica (B30). Gi: gluma inferior; Gs: gluma superior; Li: lema da floreta inferior (masculina); Ls: lema floreta superior (hermafrodita); MFs: meristema floral da floreta hermafrodita; St: estame; Gn: gineceu. Não é possível visualizar a pálea nessas imagens (Imagens de microscopia de varredura cedidas por Adriana Rodriguez).

1.3. MADS-Box

1.3.1. Definição

Genes tipo MADS-Box codificam fatores de transcrição responsáveis pelo desenvolvimento de células de leveduras, plantas e animais. O nome MADS é formado pelas iniciais dos primeiros quatro membros da família a serem analisados – *MINICHROMOSSO MAINTENANCE1* (MCM1), *AGAMOUS* (AG), *DEFICIENS* (DEF) e *SERUM RESPONSE FACTOR* (SRF) (Schwarz-Sommer et al., 1990). Eles regulam alguns mecanismos como: identidade do meristema, tempo de florescimento, determinação da flor, desenvolvimento do óvulo, identidade e desenvolvimento do fruto, alongação lateral da raiz (Zhang et al., 1998, Causier et al., 2002). Alvarez-Buylla e colaboradores (2000) detectaram expressão de MADS-Box em células guarda e tricomas, constituintes da epiderme de folhas. O gene homeobox *GLABRA2* foi descrito como participante da regulação do desenvolvimento da epiderme de raiz e folha de *Arabidopsis thaliana* (Masucci et al., 1996). Novos estudos devem ser conduzidos para analisar a função de genes MADS-Box que apresentam padrão de expressão similar ao *GLABRA2* e investigar sua participação nessa via conservada de regulação (Alvarez-Buylla et al., 2000).

1.3.2. O modelo ABCDE

Os fatores de transcrição que compõem a família MADS-Box interagem de forma combinatória (Coen et al., 1991). Coen e Meyerowitz (1991) definiram três regiões (A, B e C) do meristema floral que coincidem com o domínio de ação de genes florais homeóticos, baseando-se em estudos de mutantes *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus*, dicotiledôneas típicas que, portanto, possuem o meristema floral organizado em quatro camadas concêntricas. A região A compreende as camadas 1 e 2 do meristema floral que dará origem às sépalas e pétalas, respectivamente. A região B representa as camadas 2 e 3, que serão as pétalas e estames. Na parte mais interna da flor, encontra-se a região C, determinada pelas camadas 3 e 4, que serão os estames e carpelos (Weigel et al., 1994). Devido à complexidade do desenvolvimento floral e à variabilidade das angiospermas, estudos em diversas plantas determinaram a adição de duas novas funções no modelo original ABC, função D e E (Figura 3) (Theissen, 2001).

A função D foi adicionada como resultado de estudos relacionados ao desenvolvimento de óvulo em *Petunia*. (Angenent et al., 1995; Angenent et al., 1996; Colombo et al., 1995). A função E surgiu após a descoberta dos genes *SEPALLATA* utilizando um triplo mutante de *sepallata (sep) 1, 2 e 3* que permitiu a formação de órgãos parecidos com sépalas em cada camada do meristema floral (Pelaz et al., 2000). Honma e colaboradores e Pelaz e colaboradores em 2001 provaram que a expressão ecotópica de *SEP* juntamente com outros genes da classe A e B gerou a metamorfose de folhas em pétalas. Esses experimentos demonstraram claramente que pétalas são folhas modificadas. A classe E, portanto está envolvida na formação de sépala, pétala, carpelo, estame e óvulo (Weigel et al., 1994; Angenent et al., 1996; Kater et al., 2006).

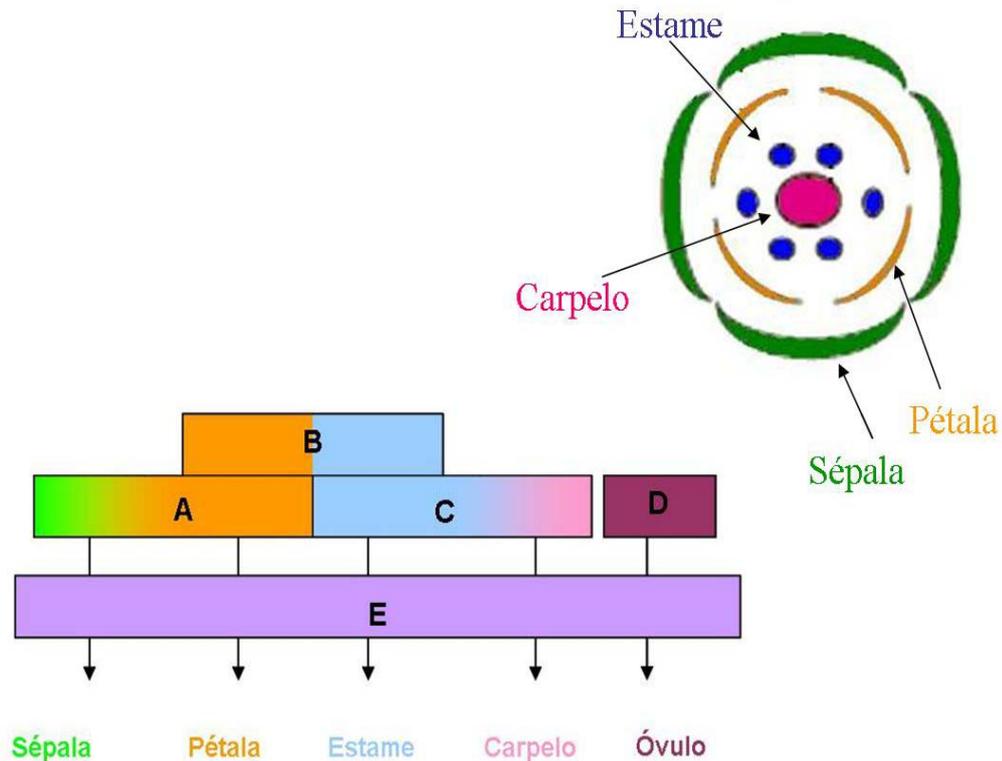


Figura 3. Organização do órgão floral de dicotiledôneas (direita) e o modelo ABCDE (esquerda). O órgão floral (direita) é organizado em camadas concêntricas. A camada 1 corresponde à sépala; a camada 2 à pétala; a 3 ao estame e a 4 corresponde ao carpelo. A região A do modelo ABCDE (esquerda) atua nas camadas 1 e 2; a região B, nas 2 e 3; a região C, nas 3 e 4. A região D atua no óvulo e a E, em todas as camadas. O modelo ABCDE foi adaptado de Kater e colaboradores (2006) e Becker e colaboradores (2000) e a organização do órgão floral de Weigel e colaboradores (1994).

1.3.3. Desenvolvimento floral de angiospermas e o modelo ABC

Os progressos obtidos no conhecimento da evolução floral devem-se principalmente à análise filogenética associada aos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento floral (Baum, 1998). O estudo do modelo ABC e a da constância da organização dos órgãos florais em diferentes espécies de angiospermas confirmam a hipótese de que existe um controle genético comum no programa de especificação dos órgãos florais em angiospermas (Bowman, 1997).

O modelo ABC baseia-se na modulação de genes MADS-Box, que agindo em combinação conferem identidade dos órgãos florais. Devido à facilidade de manipulação genética, o mecanismo molecular que regula o desenvolvimento floral, estudado inicialmente em *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus* (Coen et al., 1991,

Riechmann et al., 1997; Bowman et al., 1999), foi posteriormente descrito em diferentes plantas: *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Eucalyptus globulus*, *Rumex acetosa*, *Silene latifolia*, *Populus trichocarpa*, *Gerbera sp.*, *Elaeis guineensis*, *Ginkgo biloba*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Asparagus officinalis*, *Tulipa gesneriana* (Vandenbussche et al., 2004; Jang et al., 2002; Pnueli et al., 1991; Southerton et al., 1998; Ainsworth et al., 1995; Hardenack et al., 1994; Leseberg et al., 2006; Laitinen et al., 2006; Adam et al., 2005; Jager et al., 2003; Mena et al., 1996; Pelucchi et al., 2002; Park et al., 2003; Kanno et al., 2003).

As angiospermas apresentam um único padrão na localização relativa dos órgãos florais. As flores são organizadas em quatro camadas concêntricas de sépalas, pétalas, estames e carpelo. As sépalas representam a camada mais externa. As flores em gramíneas, entretanto, apresentam estruturas diferenciadas como pálea, lema e lodículas, além dos estames e carpelos. Estudos em *Oryza sativa* e *Zea mays*, representantes da família Poaceae, sugerem que o programa genético envolvido na especificação desses órgãos em monocotiledôneas apresenta o mesmo padrão das dicotiledôneas (Mena et al., 1995; Mena et al., 1996; Bowman, 1997; Kang et al., 1998; Ambrose et al., 2000). Mutantes de genes ortólogos das classes A, B e C de MADS-Box em arroz sugerem paralelismo da organização dos órgãos florais entre gramíneas e dicotiledôneas (Shimamoto et al., 2002). A lema e a pálea correspondem às glumas e sépalas, respectivamente, e as lodículas às pétalas (Favaro et al., 2002) (Figura 4).

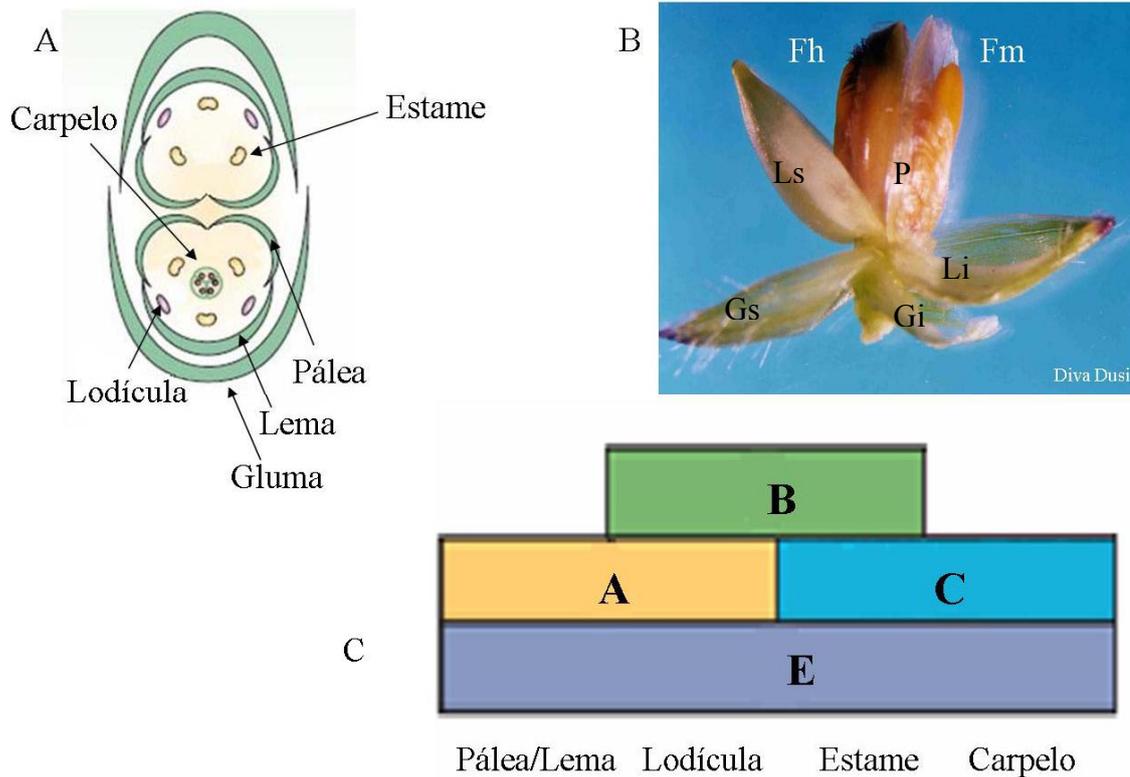


Figura 4. A: Esquema da organização floral adaptado para *Brachiaria* com uma flor hermafrodita e outra masculina. B: Espigueta de *Brachiaria* apresentando flor hermafrodita (Fh) e masculina (Fm). C: Modelo ABC para monocotiledôneas. Adaptação de Bowman (1997) e Krizek e colaboradores (2005). Gs: gluma superior; Gi: gluma inferior; Ls: lema superior; Li: lema inferior; P: pálea

1.3.4. Estudos filogenéticos

Alvarez-Buylla, Pelaz e colaboradores em 2000 classificaram MADS-Box em dois grandes grupos: Tipo I e Tipo II. As análises filogenéticas sugerem que houve uma duplicação antes de ocorrer a divergência entre animais e plantas. MADS-Box do tipo MIKC e proteínas *MYOCYTE ENHANCER FACTOR2*-like (MEF2-like) formam o Tipo II enquanto *SERUM RESPONSE FACTOR*-like (SRF-like) e proteínas MADS-Box, que não possuem o domínio K, constituem o Tipo I (Alvarez-Buylla et al., 2000).

No ano de 2003, Parenicova e colaboradores organizaram esses genes em cinco grupos: MIKC, M_{α} , M_{β} , M_{γ} , M_{δ} . Acredita-se que esses grupos surgiram de uma duplicação anterior à divergência entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Entre as características que diferenciam os grupos, aquelas consideradas principais são a localização no cromossomo e o tamanho do gene. As classes MIKC e M_{δ} possuem múltiplos íntrons enquanto as demais não possuem ou possuem um único íntron. Além disso, proteínas classificadas como MIKC foram encontradas em todos os cinco

cromossomos de *A. thaliana* e os demais tipos estão localizados somente nos cromossomos I e V (Parenicova et al., 2003).

O tipo MIKC possui quatro estruturas modulares características, que são os domínios: MADS-Box (M); Intervening (I); Keratin-like (K) e C-terminal (C).

O domínio M é responsável pela associação da proteína ao DNA e possui uma região consenso conhecida como CArG-box, constituída de aproximadamente 56 resíduos de aminoácidos (Riechmann et al., 1996). O domínio K possui uma estrutura *super coiled-coil* e facilita a dimerização, que é especificada pelo domínio I - pouco conservado (Davies et al., 1996). O domínio C é o menos conservado e auxilia na formação do complexo multimérico (Egea-Cortines et al., 1999).

Em monocotiledôneas, estudos filogenéticos de MADS-Box foram analisados em cana-de-açúcar, sorgo, milho e arroz (Dornelas et al., 2001; Pelucchi et al., 2002; Mena et al., 1995; Greco et al., 1997).

1.3.5. Genes tipo MADS-Box e a apomixia

Ozias-Akins (2006), Tucker e colaboradores (2003), Koltunow e Grossniklaus (2003) sugerem a apomixia como um resultado da interação de genes presentes na reprodução sexual. Entre eles estão aqueles envolvidos com a identidade do órgão floral e com o seu padrão de formação (MADS Box genes, *ANT*, *BEL1*, *HLL*, *INO*, *LUG*), os responsáveis pela formação do saco embrionário e da célula-mãe do megásporo (*NZZ/SPL*, *MAC1*, *AMI*, *AFD*, *SWII*, *EL*, *AGP18*), pela iniciação do embrião (*SERK*, *LEC*, *BBM*, *WUS*) e pela formação do endosperma (*FIS*, *FIE*, *MEA*) (Ozias-Akins, 2006).

Não estão ainda completamente descritos os genes e os mecanismos de regulação da expressão gênica que levam à morfogênese dos ovários de plantas (Grossniklaus, 2001). O estudo de genes do tipo MADS-Box, portanto, além de contribuir na elucidação dos mecanismos genéticos envolvidos na formação dos órgãos florais, pode gerar informações adicionais na relação entre apomixia e sexualidade. *Brachiaria* constitui um complexo agâmico com plantas de modo de reprodução sexual e apomítico e por isso é um ótimo sistema para o estudo de MADS-Box e verificação de seu envolvimento com a apomixia.

2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi de analisar a expressão de genes do tipo MADS-Box identificados em ovários de *B. brizantha* buscando compreender sua relação com a formação dos órgão florais e assim contribuir para a identificação de genes envolvidos na diferenciação dos modos de reprodução sexual e apomítico.

3. Material e Métodos

3.1. Material Vegetal

Todo material vegetal foi coletado no campo e na casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As folhas e raízes foram coletadas na casa de vegetação. Foram consideradas apenas as folhas bandeiras, que são as mais novas, e as pontas das raízes. As anteras, ovários e meristemas florais foram coletados de plantas mantidas no campo. Todos os tecidos foram extraídos de diversas plantas nos acessos BRA 00591- B30, *B. brizantha* tetraplóide apomítica, cv. Marandu e BRA 002747- B105, sexual diplóide. Os ovários em megasporogênese e megagametogênese foram extraídos dos pistilos utilizando microscópio estereoscópico Stemi SV6 (Figura 5). Os ovários foram classificados de acordo com Araújo e colaboradores (2000b). Foram coletados 250 ovários por tubo de microcentrífuga e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. No caso das anteras, foram coletadas 200 anteras. Os tubos que não foram usados imediatamente foram estocados a -80°C.

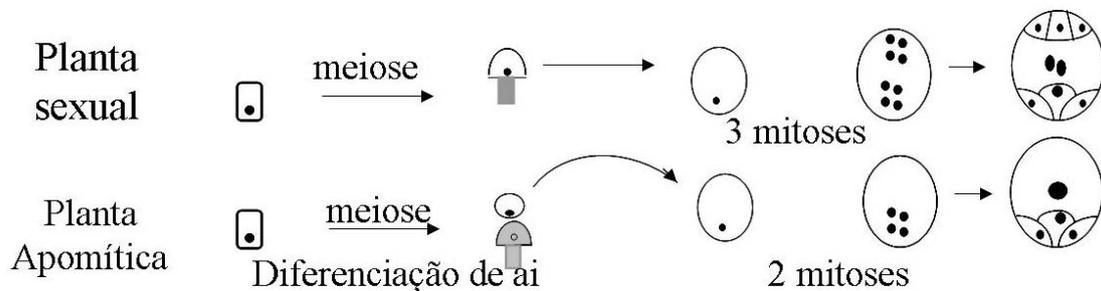
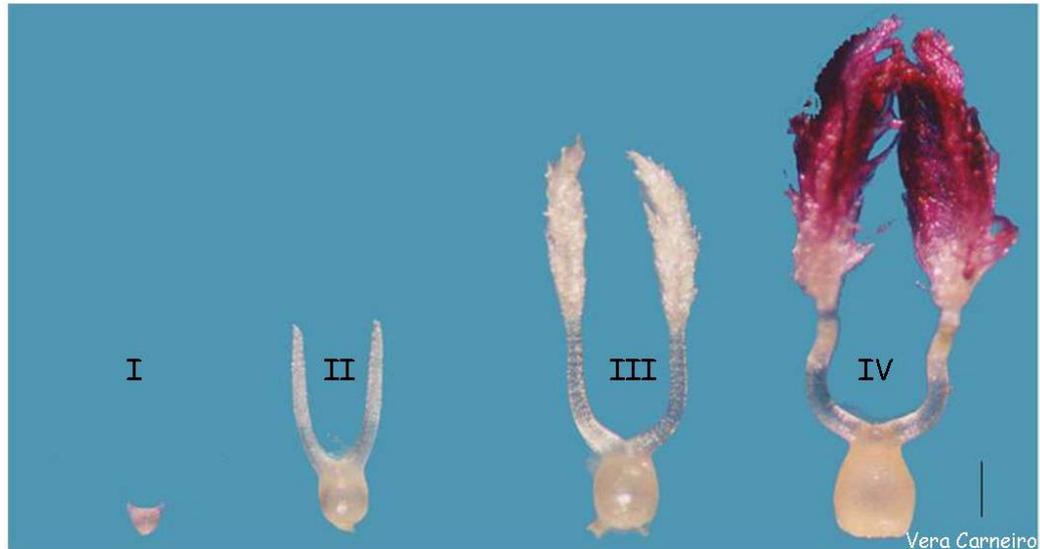


Figura 5. Ovários de *Brachiaria brizantha* nos estágios de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (III e IV) e os processos envolvidos em cada estágio de desenvolvimento do ovário. Barra: 1mm.

3.2. Construção de bibliotecas de cDNA de ovários de *B. brizantha* apomítica em megasporogênese

Foram construídas bibliotecas de cDNA com o *kit SMART cDNA Library Construction Kit* (Clontech[®]) de acordo com as especificações do fabricante, a partir de RNA poli A+ purificado com *Dynabeads* (Dyna[®]). Os insertos obtidos pela LD PCR foram ligados no vetor pTriplEx2 (Figura 6) e transfectados em *E. coli* XL1 Blue. O DNA plasmidial foi extraído e purificado dos clones e seqüenciados nos seqüenciadores automáticos ABI 377 e 3700.

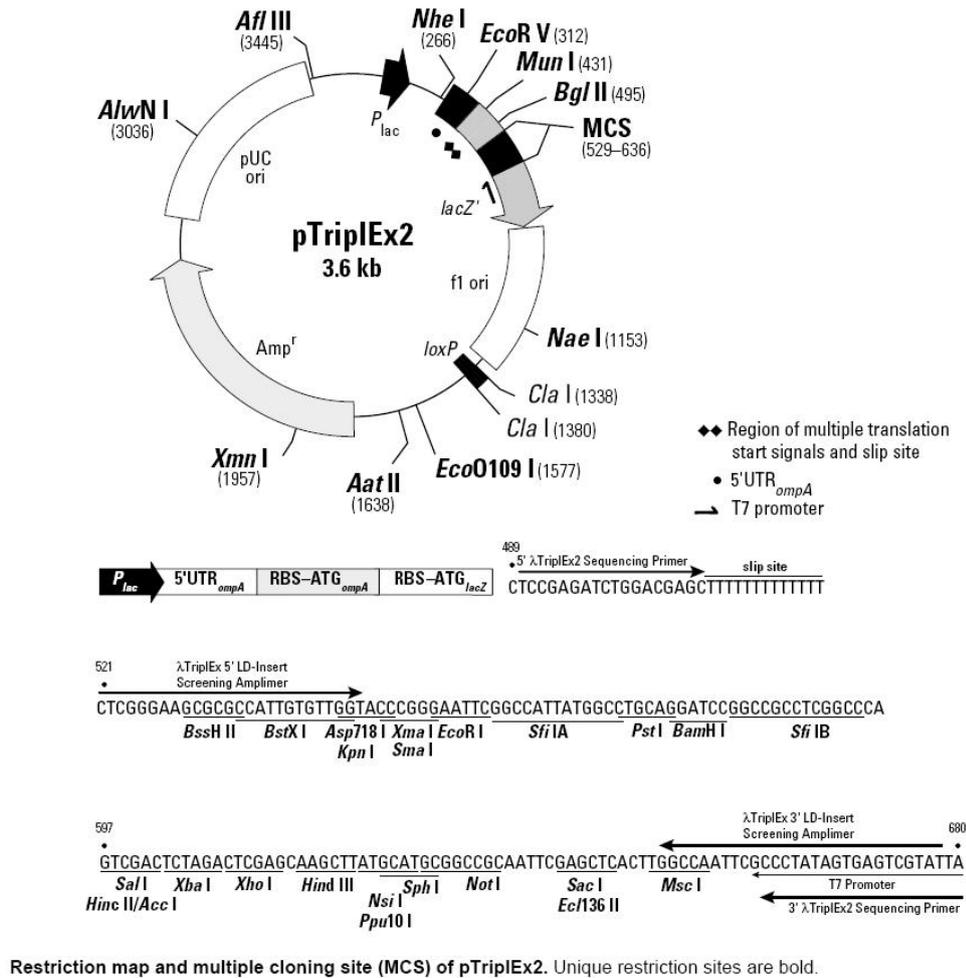


Figura 6. Mapa do vetor pTriplEx2. O vetor de 3,6 kb apresenta o gene da β -galactamase (Amp^r) que confere resistência à ampicilina, os promotores T7 e Sp6 flanqueando o sítio de múltipla clonagem para o gene *lacZ*.

3.2.1. Purificação de RNA poli A+

O RNA poli A+ foi isolado com *Dynabeads* (Dyna[®]) (de acordo com as especificações do fabricante) utilizando entre 40 e 100 μ g de RNA total de ovários de *B. brizantha* apomítica (BRA 00591- B30) em megasporogênese (estágios I e II) estocados a -80° até a utilização. O RNA total foi extraído com Trizol[®] de acordo com as especificações do fabricante.

Os volumes foram ajustados para 100 μ L com água tratada com DEPC 0,1% e foi adicionado o mesmo volume do tampão de ligação (*Binding Buffer*). O RNA foi desnaturado por 2 minutos a 65° C e colocado imediatamente no gelo. Enquanto isso, 200 μ L de *Dynabeads* foram ressuspensos e colocados no concentrador magnético de partículas (MPC) e o sobrenadante foi substituído por 100 μ L do tampão de ligação. Em

seguida, foi adicionado o RNA à suspensão *Dynabeads* e colocado no MPC. Após o clareamento da solução, o sobrenadante foi removido e a suspensão *Dynabeads* lavada 2 vezes com 200 μL do tampão de lavagem (*Washing Buffer*). O RNA foi ressuspendido em 5 μL de Tris 10 mM livre de RNAses e aquecido por 2 minutos a 80°C. A separação da suspensão *Dynabeads* e do RNA poli A+ foi feita colocando o tubo no MPC e coletando o sobrenadante em um tubo novo livre de RNAses.

3.2.2. Síntese da primeira fita de cDNA

A reação de síntese da primeira fita foi feita adicionando-se entre 1,5 μL e 2 μL de RNA poli A+, 1 μL do iniciador *SMART IV* (10 μM), 1 μL do CDS III/3' PCR (10 μM) e 1 μL de água bidestilada. As amostras foram desnaturadas a 72°C, por 2 minutos, e, depois, incubadas no gelo por 2 minutos. Foram adicionadas às amostras 2 μL do tampão da primeira fita (*First Strand Buffer*) 5X, 1 μL de DTT (20 mM), 1 μL de dNTP's (10 mM) e 1 μL de transcriptase reversa *PowerScript*. A transcrição reversa foi feita a 42°C por 1 hora. O produto da reação foi mantido a -20°C até sua utilização.

3.2.3. LD PCR (*Long Distance PCR*)

Após determinar o número de ciclos ideal para a amplificação realizando uma LD PCR e retirando alíquotas de cada ciclo e aplicando no gel, foi feita a reação com 19 ciclos nas seguintes condições no termociclador PTC-100[®] (MJ Research): 2 minutos a 95°C; 19 ciclos de 10 segundos a 95°C e 6 minutos a 68°C. A reação foi feita com 2 μL do cDNA fita simples, 80 μL de água bidestilada, 10 μL do tampão de PCR *Advantage 2*, 10X; 2 μL de dNTP's 50X; 2 μL iniciador 5'PCR 10 μM , 2 μL do iniciador CDSIII/3' PCR e 2 μL da enzima *Advantage 2 Polymerase Mix* 50X. Alíquotas da reação foram retiradas e aplicadas em gel de agarose 1,2%. O número de 19 ciclos foi escolhido baseando-se na intensidade e no tamanho dos cDNAs amplificados, após análise por eletroforese. Uma amostra de 5 μL da reação foi aplicada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e analisada por eletroforese.

3.2.4. Tratamento com Proteinase K

Toda a reação de LD PCR foi tratada com 2 μL de proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por 20 minutos a 45°C. O material foi em seguida purificado utilizando a coluna MICROCON YM-100 (AMICON[®]).

3.2.5. Digestão Enzimática

A reação foi feita acrescentando ao material purificado 10 μL da enzima *Sfi*I (20 U/ μL), 10 μL do tampão 10X da enzima, 1 μL de BSA 100X e água bidestilada na quantidade suficiente para 100 μL . A reação foi incubada a 50°C por 2 horas.

3.2.6. Fracionamento dos cDNA's

O fracionamento foi feito na coluna CHROMA SPIN-400 de acordo com protocolo do kit. Uma amostra de 3 μL de todas as frações obtidas foi aplicada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram selecionadas as frações que apresentaram os maiores fragmentos de cDNA. Essas frações foram purificadas e concentradas usando a coluna MICROCON YM-100 (AMICON[®]) em um volume final de até 7 μL .

3.2.7. Ligação da biblioteca de cDNA

Cada ligação foi feita com 0,5 μL de T4 DNA ligase 400 U/ μL , 50 ng de vetor pTriplEx2 (Silveira, 2004), 1 μL de ATP 10 mM, água bidestilada quantidade suficiente para 10 μL , e uma quantidade variável de cDNA. O volume de cDNA utilizado dependeu do volume final do fracionamento. A reação foi incubada a 16°C por 18 horas.

3.2.8. Preparo de células competentes *E. coli* XL1 Blue para eletroporação

Uma placa contendo meio LB sólido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl e 1,6% de agar bacteriológico) e tetraciclina 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi estriada com uma alíquota de cultura de células XL1 Blue e incubada por 16 horas a 37°C. Uma colônia isolada foi selecionada, estriada em outra placa com LB sólido e tetraciclina 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubada a 37°C. A partir dessa placa, outra colônia isolada foi selecionada para fazer o pré-inóculo em 5 mL de meio LB líquido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) utilizando tubo Falcon[®] de 15 mL. Após o pré-inóculo ter ficado a 37°C, por 16 horas sob agitação de 200 rpm, este foi inoculado em 500 mL de meio L (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl) líquido pré-aquecido a 37°C. A cultura foi colocada em um agitador de tubos a 37°C, 220 rpm. Quando a absorbância em 600 nm atingiu 0,6, a cultura foi mantida no gelo por 30 minutos e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C em rotor GSA. As células foram ressuscendidas em 250 mL de água deionizada estéril gelada e centrifugadas novamente por 15 minutos a 4.000 rpm a 4°C em rotor GSA. Em seguida,

as bactérias foram ressuspensas em 10 mL de glicerol 10% gelado estéril, centrifugadas por 15 minutos, 4.000 rpm, 4°C no rotor GSA e ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%. O material foi dividido em alíquotas de 40 µL em tubos de 1,5 mL esterilizados e mantidos a 4°C e congelado em nitrogênio líquido.

3.2.9. Transformação das bibliotecas de cDNA em XL1 Blue por eletroporação

A transformação foi feita adicionando-se aos 40 µL de células competentes 2 a 4 µL de cada ligação. Após ter deixado o DNA em contato com as células por pelo menos 1 minuto, a mistura foi transferida para uma cuveta de eletroporação BioRad com 0,1 a 0,2 cm de distância entre os eletrodos. As células foram eletroporadas em eletroporador BioRad® sob as seguintes condições: 200 Ω de resistência, 25 µF de capacitância e 2,5 kV de voltagem para as cuvetas com 0,2 cm de distância entre os eletrodos e 1,8 kV para as cuvetas com 0,1 cm de distância. Após a descarga elétrica, foi adicionado rapidamente 1 mL de meio LB à suspensão de bactérias e esta foi incubada a 37°C por 1 hora sob agitação de 200 rpm. Do volume total da transformação, cerca de 50 µL foram plaqueados em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina, 20 µg/mL de X-Gal e 0,1 mM de IPTG.

3.2.10. Anotação de seqüências

As placas contendo as transformações das bibliotecas foram enviadas para a plataforma de seqüenciamento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para fazer a minipreparação plasmidial e a reação de seqüenciamento. Em seguida o resultado foi enviado para o laboratório de bioinformática para análises das seqüências. Os cromatogramas gerados foram analisados com PHRED e, após o processamento das seqüências (trimming), estas foram agrupadas com o programa CAP3, e comparadas por BLAST contra o banco não redundante de seqüências protéicas do GenBank, para verificar similaridade dos EST's (*Expressed Sequence Tags*) gerados. Somente seqüências ≥ 100 pb contendo no mínimo 50 pb com qualidade PHRED ≥ 20 foram analisadas. A anotação foi baseada em uma similaridade mínima $\leq 10^{-3}$. As bibliotecas foram validadas pela análise de 1728 clones (Silveira et al., 2006) com dados do Interpro e Gene Ontology e classificadas em quatro grupos funcionais baseado no COG (Clusters of Orthologous Groups), com algumas modificações.

As seqüências do banco de cDNA que apresentaram em primeira análise similaridade com a família de genes MADS-Box, que são os contigs 38 e 119, foram posteriormente analisadas nos programas BLASTX, BLASTN e BLASTP no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1990) e alinhadas no programa ClustalW acessado pelo programa BioEdit versão 7.0.5.3.

3.3. Extração de RNA total de ovário e antera de *Brachiaria brizantha*

Ovários (250) ou anteras (200) de *B. brizantha* mantidos a -80°C foram homogeneizados em 250 μL de Trizol[®] (de acordo com as especificações do fabricante) utilizando pistilos de poliestireno livre de RNase e uma broca (AD-18 s Bionic Drill set). Em seguida, misturou-se 25 μL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1), livre de RNase em agitador Vortex. Após a incubação no gelo por 5 minutos, o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos (centrífuga Eppendorf 5415C) a 4°C e o sobrenadante transferido para um tubo novo de 1,5 mL. A precipitação foi feita utilizando 1 volume de isopropanol por 30 minutos a 4°C . Em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 g a 4°C . O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspenso em 10 μL de água tratada com DEPC 0,1%.

A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

3.4. Extração de RNA total de folhas e raízes de *Brachiaria brizantha*

Folhas e raízes foram coletadas pela manhã e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. Cada 2 g de tecido foram macerados em cadinho livre de RNase com nitrogênio líquido. Foram adicionados e misturados ao macerado por 15 minutos à temperatura ambiente, 6 mL de fenol ácido: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) livre de RNase e 9 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M; EDTA 1 mM pH 8,0; SDS 1%). O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos em centrífuga Sorvall SS34. A fase aquosa foi transferida para tubos novos e precipitada com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 4,5 e com 2 volumes de etanol absoluto gelado por pelo menos 1 hora a -20°C . O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e o precipitado dissolvido em 2,5 mL de água gelada tratada com DEPC 0,1% e precipitado novamente com 2,5 mL de cloreto de lítio 4 M a 4°C por 16

horas. Foi feita, em seguida, uma centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi ressuspendido em 1,8 mL de água tratada com DEPC 0,1%.

Uma última precipitação foi feita com 200 µL de acetato de sódio 3 M e etanol absoluto a -20°C por 1 hora e centrifugada por 20 minutos a 10.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 200 µL de água gelada tratada com DEPC 0,1 %.

A pureza e integridade do RNA foram analisadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose 1,2% e, quando necessário, realizadas novas purificações em clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1.

3.5. RT-PCR

As reações de transcrição reversa foram feitas com quantidades entre 700 ng e 3 µg de RNA total de ovário, em megasporogênese e megagametogênese; folha; antera madura e raiz de *Brachiaria brizantha* apomítica e sexual, utilizando a enzima *Superscript II*. O RNA total utilizado para a reação de transcrição reversa não foi tratado com DNase. A PCR foi feita com um volume de cDNA do qual fosse possível inferir uma quantificação de 600 ng em um volume final de 25 µL. As reações de transcrição reversa que foram feitas com 3 µg de RNA total foram diluídas 10 vezes e apenas 2 µL foram usados nas amplificações. A PCR consistiu em desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. O resultado da amplificação foi analisado com 20, 24, 28 e 32 ciclos para determinar o grau de expressão dos genes. O gene de ubiquitina de *B. brizantha* foi utilizado como controle interno. Em relação ao contig 38, os iniciadores foram feitos em regiões 5' e 3' UTR. O contig 119 ainda não possui a região 5'UTR, mas os iniciadores foram desenhados nas extremidades da seqüência abrangendo a região 5'. A quantificação foi estimada por análise de densidade de pontos das bandas do gel de agarose no densitômetro Zero-Dscan (Scanalytics®). O valor obtido foi resultado da comparação com o controle, cDNA de ubiquitina, utilizando como referências a amplificação até o ciclo 28, no caso do contig 38, e até o ciclo 32 para o contig 119, que são os pontos antes da saturação. Utilizou-se 1 µL das reações que apresentaram amplificação para reamplificar por PCR usando o mesmo programa da amplificação para obter material suficiente para a transferência para uma membrana de Nylon Hybond™-N. Em seguida, foi feito um *Southern blot* para confirmar a amplificação das seqüências esperadas utilizando sondas marcadas radioativamente. As sondas foram

obtidas dos clones mais representativos dos contig 38 e 119 das bibliotecas de cDNA que compõem. Os clones selecionados representam apenas uma região da sequência. A sonda do contig 38 é o clone que compõe a região 5' UTR do contig; e a do 119 está localizada na extremidade 3'UTR do contig.

3.6. Minipreparação de DNA plasmidial

Uma colônia foi selecionada na placa resultante do plaqueamento da transformação e inoculada em 3 mL de meio LB líquido em um tubo Falcon[®] por 16 horas a 250 rpm, 37°C em agitador de tubos. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugado por 1 minuto, 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido e mais 1,5 mL da mesma suspensão bacteriana foram adicionados ao tubo o qual foi centrifugado por mais 1 minuto a 13.000 rpm. Após a completa remoção do sobrenadante o precipitado foi dissolvido em 100 µL da solução I (25 mM de Tris pH 8,0; 10 mM de EDTA e 50 mM de glicose) e 2µL de RNase A [10 mg/mL] utilizando um agitador. Após 5 minutos, foram adicionados 200 µL de solução II preparada na hora (NaOH 0,2 N; SDS 1%) e a solução foi misturada ao material vertendo o tubo 3 vezes. A solução foi mantida por 5 minutos no gelo para depois se adicionar 150 µL da solução III gelada (60 mL de acetato de potássio 5 M gelado; 11,5 mL de ácido acético glacial; 28,5 mL de água água destilada). Após 5 minutos no gelo a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e precipitado com dois volumes de etanol absoluto por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi lavado com 800 µL de etanol 70%. Após a secagem do material, o DNA foi ressuspensionado em 30 µL de água deionizada.

3.7. Extração de DNA genômico de *Brachiaria brizantha*

Foram coletados no campo 2,0 g de folhas de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha* e colocados diretamente em nitrogênio líquido. As folhas foram maceradas em cadinho com nitrogênio líquido e incubadas a 65°C por 1 hora em 15 mL de tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; EDTA 0,05 M pH 8,0; NaCl 0,5 M; SDS 2%; PVP 1%; β-mercaptoetanol 1%). Em seguida, o macerado foi transferido para tubos de centrífuga Sorvall SS34 e incubados no gelo por 1 hora com 4 mL de acetato de

potássio 5 M. O material foi centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm, 4°C e depois o sobrenadante foi filtrado em gaze e precipitado com 15 mL de isopropanol por 2 horas a -20°C. Após centrifugar por 20 minutos a 10.000 rpm, 4°C, o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de água destilada e tratado com 10 µL RNase A 10 mg/mL por 30 minutos. O DNA foi purificado com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), e precipitado com 70 µL de NaCl 5M e 1 mL de isopropanol e centrifugado por 15 minutos a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5415C). O precipitado foi ressuspensionado em 500 µL de água deionizada.

3.8. Análise de Restrição do DNA genômico de *B. brizantha* com enzimas de restrição

A digestão de DNA genômico das plantas de *B. brizantha* foi feita com enzimas de restrição ausentes e presentes nas seqüências de cDNA dos contigs 38 e 119. Cada reação foi feita com 30 µg de DNA genômico e 10 unidades de enzima para cada µg de DNA e foi incubada a 37°C em banho-maria por 16 horas. As enzimas utilizadas foram *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* e *SacI*.

3.9. Southern-blot

O DNA genômico (30 µg) após digestão e os produtos das reamplificações por PCR das RT-PCRs foram aplicados no gel de agarose 1% e submetido a uma voltagem de 100 V, de acordo com o tamanho da cuba eletroforética (35 cm). O gel foi incubado por 30 minutos na solução de desnaturação (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M), lavado com água destilada e incubado na solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; NaCl 1,5 M) por mais 30 minutos e lavado novamente com água destilada. A solução tamponante SSPE 20X (NaCl 3 M; NaH₂PO₄.H₂O 0,2 M; Na₂.EDTA.2H₂O 20 mM; pH 7,4) foi colocada no recipiente. O gel foi colocado sobre uma ponte feita de papel filtro Whatman[®]. Sobre o gel foi colocada uma membrana de Nylon HybondTM-N, três folhas de papel filtro, papel toalha na altura de 10 cm e um peso de 1 kg. Esse sistema de transferência por capilaridade ficou montado por 16 horas.

A membrana, após ter secado um pouco, foi colocada no UV Stratalinker 2400 (Stratagene[®]) e depois em um frasco de vidro próprio para radioatividade e incubado por pelo menos 1 hora na solução de pré-hibridização (SSPE 5X; Solução de Denhardt 5X; SDS 0,5%; 20 µg/mL de DNA espermatozoides de salmão) a 55°C. Em seguida foi adicionada a sonda previamente aquecida a 100°C por 3 minutos e marcada com

radioatividade utilizando o kit *Ready-to-go*TM (GE Healthcare). A hibridização foi feita a 55°C por 16 horas.

A membrana foi lavada com as soluções I (SSPE 2X; SDS 0,1%), II (SSPE 1X; SDS 0,1%) e III (SSPE 0,1X; SDS 0,1%) entre 15 e 30 minutos e depois foi colocada no cassete contendo *Imaging Plate* (IP) BAS-IP MS2340 (Fujifilm[®]) e a imagem processada no aparelho Phospho Image. As análises foram feitas no programa Multi Gauge V3.0. Os *reads* mais representativos de cada contig foram utilizados para a marcação da sonda do *Southern* com o DNA genômico digerido com diferentes enzimas. Os *reads* B30IeII001G05 e B105IV001G03 foram utilizados para a marcação da sonda para os contig 38 e 119, respectivamente.

3.10. Análises filogenéticas

As seqüências MADS-Box de gramíneas e outras espécies de plantas foram obtidas em bancos de dados como *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *The Institute for Genomic Resources* (TIGR, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>) utilizando a região conservada do domínio MADS para fazer a busca. Os agrupamentos das seqüências foram feitos no programa CAP3 (Huang et al., 1999) e os alinhamentos gerados pelo ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>). O software The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 2.0 (Kumar et al., 2000) foi usado para gerar as árvores filogenéticas utilizando seqüências de aminoácidos. As seqüências de aminoácidos deduzidas de MADS-Box de *B. brizantha* foram inseridas nas análises para identificar a localização na árvore e o grau de parentesco com os diferentes tipos de MADS-Box e espécies. A análise foi feita com método *Neighbor Joining* e com seqüências de resíduos de aminoácidos do domínio MADS contendo aproximadamente os 50 primeiros resíduos de aminoácidos de cada proteína. A solidez da árvore foi feita com a ferramenta bootstrap (100 replicações).

3.11. PCR para ampliar o contig 119

A seqüência do contig 119 ainda não está completa e por isso foi desenhado o iniciador 5 (Figura 8) na seqüência de *Zea mays* m6 (gi: 29372767) com a qual apresentou similaridade. A reação de PCR consistiu em desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 68°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. O produto obtido foi extraído do gel utilizando o kit QIAEX II QIAGEN[®], clonado no

vetor pCR[®]2.1 de acordo com o kit *TA cloning[®]Kit* (Invitrogen[™]) e transformado em célula competente XL1 Blue. Após a minipreparação do DNA plasmidial, o material foi enviado para a plataforma de seqüenciamento na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e seqüenciado no seqüenciador automático ABI 377.

3.12. Hibridização in situ

3.12.1. Preparo do material

Racemos foram coletados de plantas com o auxílio de tesoura de poda, colocados em frascos com água e levados ao laboratório. Ovários e anteras em diferentes estágios de desenvolvimento (Araújo et al., 2000a) e meristemas florais 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, anteras e meristemas mantidos na nova solução por 16 horas à 4°C. As amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M e em seguida desidratadas em série crescente de álcool etílico nas concentrações de 30%, 50% e 70% , 90% e 100%, 30 minutos cada. O material a ser incluído em parafina foi corado em eosina 20% em etanol 70%. O material que não foi usado no momento foi armazenado a -20°C em álcool etílico 70%.

3.12.2. Inclusão em BMM

O material já desidratado foi embebido em série crescente de álcool etílico: butil-metil-metacrilato (BMM) nas proporções de volume 5:1, 5:2, 5:3, 5:4, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. Foram feitas, em seguida, duas trocas de BMM 100% por pelo menos 4 h cada. Foi colocada uma amostra em cada cápsula plástica contendo BMM e polimerizada a 4°C por 48 h sob luz ultravioleta 815 2537 Ao (15 watts). Após polimerização, as amostras foram estocadas a 4°C. Secções de 3,0 - 3,5 µm foram obtidas utilizando um ultramicrotomo Leica Ultracut-UCT e colocadas sobre lâminas ProbeOn[™] Plus Microscope Slides Charged and Precleaned (FisherBiotech[®]). As secções foram colocadas sobre gotas de água tratada com DEPC 0,1%, 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), uma vez em acetona: água tratada com DEPC 0,1% (1:1; v/v) por 10 min e duas vezes em água tratada com DEPC 0,1% (10 min cada).

3.12.3. Inclusão em parafina

O material desidratado foi tratado em uma série crescente de xilol: álcool etílico nas proporções de volume de 1:3; 1:1; 3:1 por 30 minutos. Em seguida, foram feitas 3 trocas de xilol 100%, 60 minutos cada. Após a parafina ter sido derretida a 58°-60°C, foi-se retirando o xilol e adicionando aos poucos a parafina derretida até obter-se somente parafina na amostra. Esse processo durou aproximadamente 4 dias. O material foi transferido para os moldes contendo parafina derretida e armazenados a 4°C. Secções de 7 µm foram obtidas utilizando o micrótomo rotativo manual Leits 1512 e colocadas sobre lâminas ProbeOn™ Plus Microscope Slides Charged and Precleaned (FisherBiotech®). As secções foram colocadas sobre gotas de água tratada com DEPC 0,1% e aquecidas a 42°C por pelo menos 16 horas. Para a remoção da parafina, as lâminas foram mergulhadas duas vezes em xilol 100%, 10 minutos cada; 5 minutos em xilol:álcool etílico (1:1, v/v); 10 minutos em álcool etílico 100%; 5 minutos em álcool etílico: água tratada com DEPC 0,1% (1:1, v/v); e duas vezes por 5 minutos cada em água tratada com DEPC 0,1%.

3.12.4. Teste com laranja de acridina

Para verificar a preservação do RNA presente nas amostras, algumas secções foram coradas com laranja de acridina 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, 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.

3.12.5. Síntese das sondas marcadas com digoxigenina

Foram utilizados como molde para as sondas de mRNA fragmentos dos cDNA de seqüências do tipo MADS-Box identificados nas bibliotecas de cDNA de ovários em diferentes estágios de desenvolvimento. Os fragmentos foram obtidos por PCR utilizando um par de iniciadores 3 e 4 para o contig 38 e um par de iniciadores 7 e 8 para o contig 119, desenhados na região 3'UTR de cada seqüência (Figura 8). Em seguida, os produtos da PCR foram clonados no vetor *pGEM[®]-T Easy Vector Systems* (Invitrogen[®]) (Figura 7) e mantidos em bactérias *XL1 Blue* de *Escherichia coli* estocadas em glicerol 20% a -80°C. O DNA plasmidial foi extraído como descrito no item 3.6.

Os plasmídios contendo os fragmentos de cDNA referentes aos contig38 e contig 119 foram linearizados por digestão com *SalI* ou *NcoI* e purificados em fenol: clorofórmio (1:1; v/v) seguido de lavagem em clorofórmio puro. A precipitação foi realizada com NaAc 3 M, pH 5,5 : álcool etílico 100% (1:10; v/v), a -80°C por 1 h. O precipitado foi lavado com álcool etílico 70%, secado ao ar livre, ressuspenso em 25 µL de água DEPC e estocado à -20°C.

As sondas de mRNA, senso e anti-senso, foram sintetizadas por transcrição in vitro utilizando o *DIG RNA Labeling Kit* (Roche®), a partir dos fragmentos de cDNA clonados no vetor *pGEM®-T Easy* e linearizados com *SalI* e *NcoI*. Foram utilizadas as enzimas RNA polimerase T7 e SP6 respectivamente.

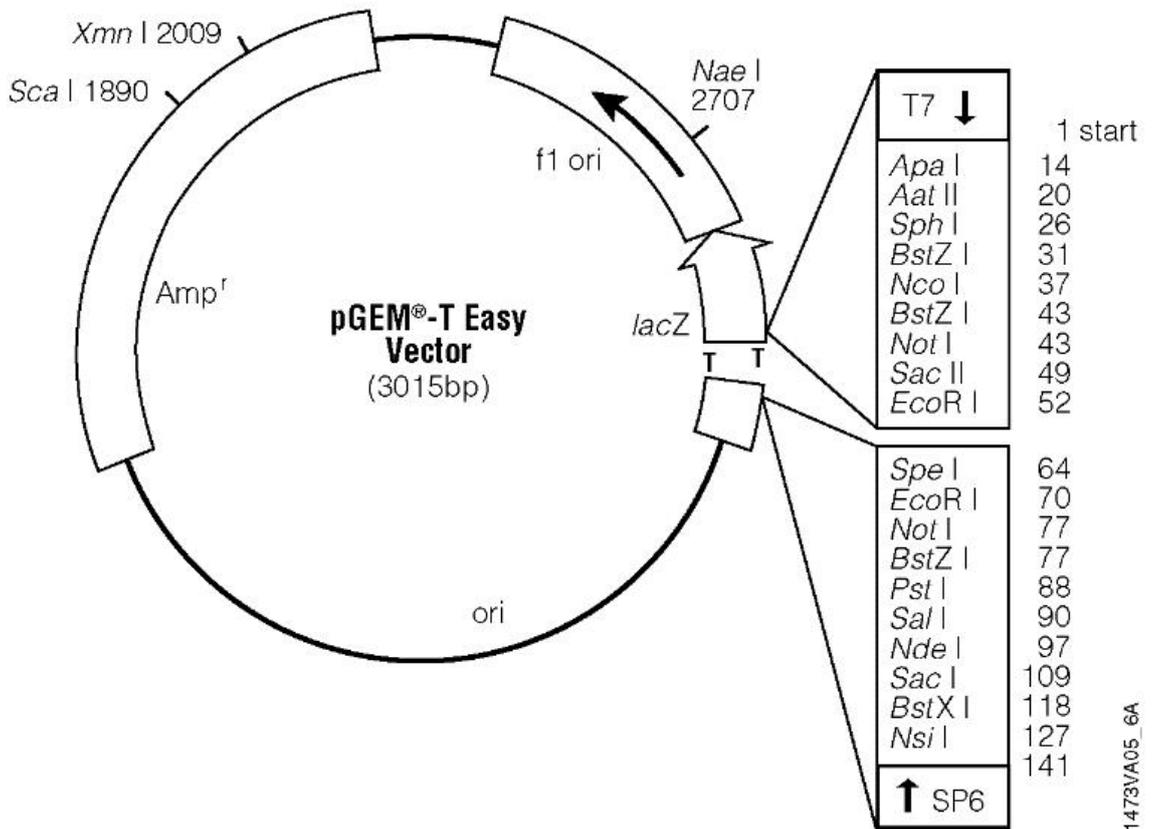


Figura 7. Mapa do vetor *pGEM®-T Easy* (Pomega®). O vetor possui 3015pb, Promotores T7 e SP6 flanqueando o sítio múltiplo de clonagem com o gene *lacZ*, gene da β-galactamase (*Amp^r*), que confere resistência a ampicilina e origem de replicação do plasmídio (*ori*).

1473VA05_6A

3.12.6. 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 µL da sonda sintetizada e 1 µL 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® 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 µL de *5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt* - BCIP (0,05 g/mL) e 15 µL de *Nitro-Blue Tetrazolium Chloride* - NBT (0,05 g/mL) em 5 mL de tampão de detecção III (0.1 M Tris HCl pH 7.5; 0.1 M NaCl; 0.05M MgCl₂, pH 9,5) por cerca de 30 min no escuro. A reação de coloração foi finalizada pela adição do tampão de detecção IV (Tris-HCL 0,1 M pH 8,0; ácido etileno diamino tetra-acético (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).

3.12.7. Reação de hibridização

As secções foram incubadas com 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL®), 60 ng de sonda em 100 µL 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 16 h.

3.12.8. 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 = 3 M NaCl; 0,3 M Na₃-citrato, pH 7,0), por 30 min cada. Em seguida foram lavadas por 5 min em tampão de detecção I (0.1 M

Tris HCl - pH 7.5; 0.15 M NaCl) e incubadas por 30 min no tampão de detecção II (Blocking Solution Roche®). 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 2h 30min. Após duas lavagens seguidas, de 15 min, em tampão de detecção I e uma lavagem em tampão de detecção III (0.1 M Tris HCl pH 7.5; 0.1 M NaCl; 0.05 M MgCl₂) as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL 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.

Após a fotodocumentação em microscópio de Luz Zeiss-Axiophot, 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 e montadas com Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific).

3.13. Reação de qRT-PCR

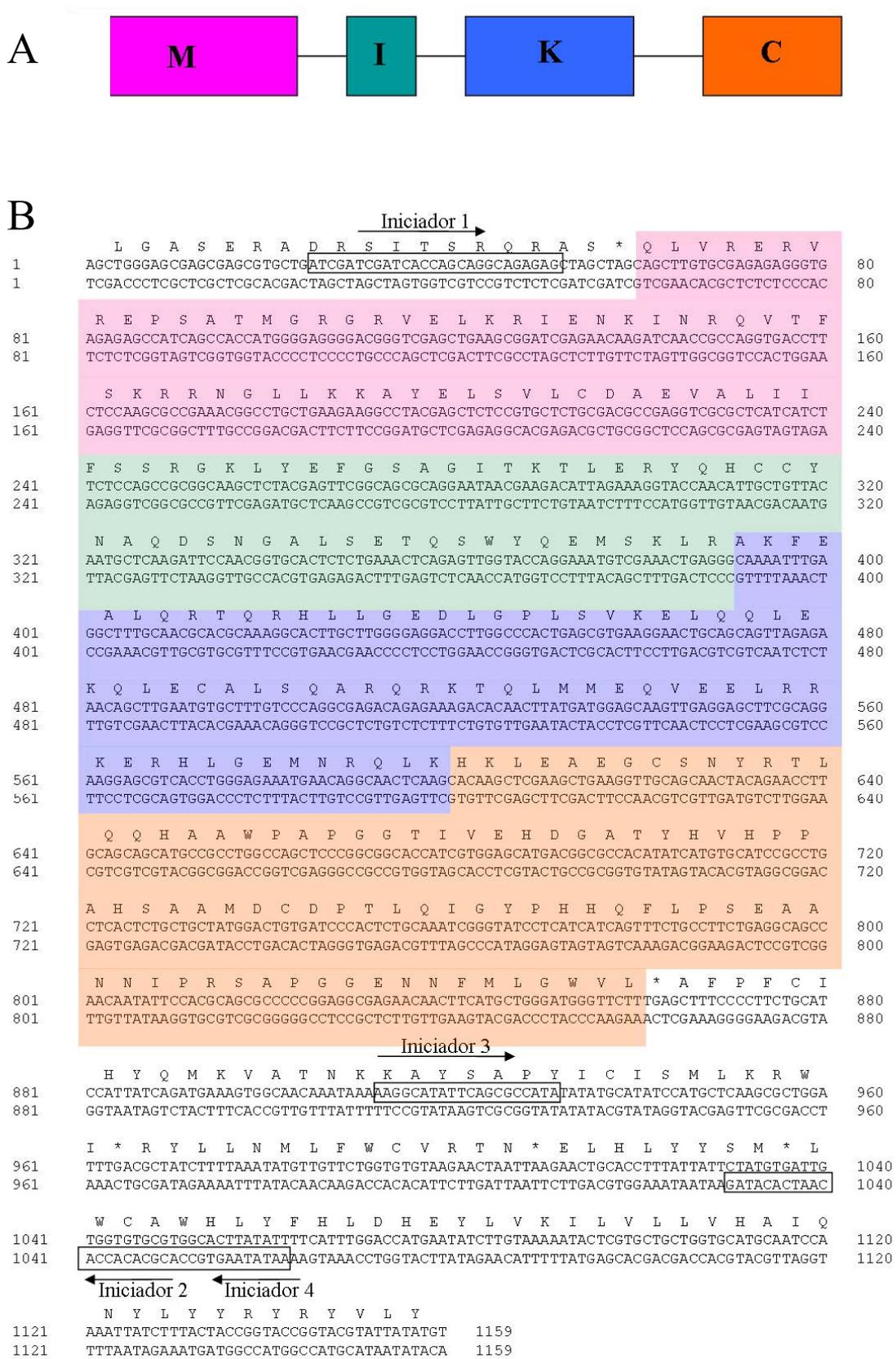
Para reação de qRT-PCR foram utilizados cDNA's sintetizados por transcrição reversa a partir de 2 µg de RNA total de ovário, antera e flor em diferentes estágios de desenvolvimento, folha e raiz de *B. brizantha* apomítica e sexual em um volume final de 20 µL utilizando a enzima Superscript II (Invitrogen™). A extração do RNA total foi feita de acordo com os itens 3.3 e 3.4. O RNA total foi tratado com DNase (Amersham™) utilizando 0,5 U de enzima/µg de RNA e purificado com o kit RNAeasy® (QIAGEN™). A reação de qRT-PCR foi feita em um volume final de 20 µL, utilizando 0,1 µL de cDNA fita simples. Para cada reação foi utilizado Tampão PCR (Invitrogen™) 1X concentrado, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 0,1 mM, 0,25 U *Taq Platinum* (Invitrogen™), SYBR Green (Amersham™) 0,1X concentrado, 0,2 µM de cada iniciador. Os iniciadores 3 e 4 foram utilizados para o contig 38 e os iniciadores 7 e 8 para o contig 119 (Figura 7).

As reações foram feitas sob as seguintes condições, usando Chromo4 Real Time PCR Detector (BioRad™): 5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60°C, 15 segundos a 72°C, 35 segundos a 60°C. A curva de dissociação foi feita de 30°C a 100°C, com leitura a cada 1°C. Os dados gerados a partir do software Opticon 3, utilizado para leitura de fluorescência, foram colocados em planilha MS Excel (Microsoft, Redmond, WA), e analisados no aplicativo visual basic do MS Excel qBase

versão 1.3.4. (<http://medgen.ugent.be/qbase/>). Os genes referência para *B. brizantha* foram previamente determinados (Silveira et al., 2007).

3.14. Seqüências dos contig 38 e 119 seus domínios conservados e os iniciadores

Os iniciadores utilizados nos experimentos de RT-PCR, qRT-PCR e hibridização in situ não foram desenhados na região conservada dos genes MADS-Box para garantir especificidade. A figura 8 apresenta os domínios conservados dos genes MADS-Box. Em 8A encontra-se o esquema dos domínios identificados no contig 38 (figura 8B) e no contig 119 (figura 8C). Os domínios conservados dos genes MADS-Box foram identificados utilizando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) para o alinhamento com seqüências já depositadas em banco e dados e caracterizadas.



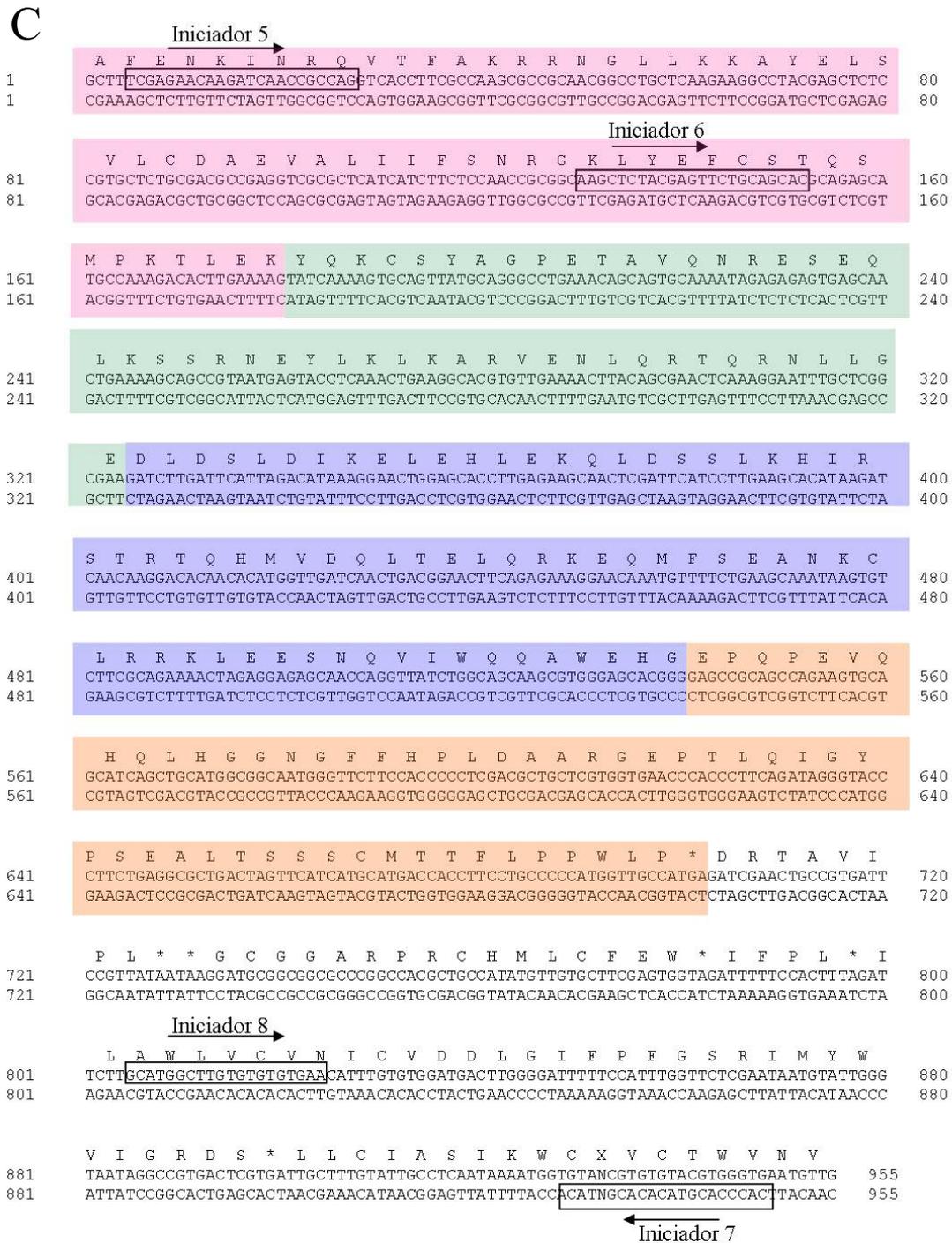


Figura 8. Identificação dos domínios conservados e localização dos iniciadores utilizados nos experimentos deste trabalho. A: esquema dos domínios conservados de MADS-Box correspondentes às áreas hachuradas. B: seqüência de aminoácidos deduzida e de nucleotídeos referente ao contig 38. C: seqüência de aminoácidos deduzida e de nucleotídeos referente ao contig 119.

4. Resultados

4.1. Construção da biblioteca de cDNA de ovário de *Brachiaria brizantha* apomítica em megasporogênese

4.1.1. Extração de RNA total

A integridade do RNA total extraído foi conferida por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio 0.1%. A presença das duas subunidades do RNA ribossomal foi considerada como indicativo da integridade (Figura 9). A pureza do RNA foi inferida a partir da razão das absorbâncias em 260nm/280nm. Um valor próximo de dois é aceito para RNA. O valor obtido no espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf®) foi de 1,86.



Figura 9. Perfil eletroforético de RNA total de ovário de B30 estágios I e II (megasporogênese). Foi aplicado 1 μ L do RNA total em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 1 μ L/mL.

4.1.2. Fracionamento de cDNA

As frações selecionadas para a biblioteca de cDNA de ovários de *B. brizantha* apomítica em megasporogênese foram as sete primeiras (Figura 10).



Figura 10. Perfil de eletroforese em gel de agarose 1.1% corado com brometo de etídeo 1 μ g/mL. 1: corresponde a 1 Kb DNA ladder (Invitrogen®). Foram aplicados no gel 3 μ L de cada fração. Fracionamento dos cDNAs da biblioteca B30 estágios I e II após separação em coluna CHROMA SPIN-400.

4.1.3. Análise de seqüências das bibliotecas de cDNA de ovários de *Brachiaria brizantha* sexual e apomítica

Até o momento foram obtidos no presente trabalho e no trabalho de Silveira (2004) 2.976 clones. Do total de clones seqüenciados, 73,9% apresentaram qualidade para análises e desses, 58,9% não apresentaram similaridade no banco de dados de seqüências protéicas (Tabela 1). Dos clones com qualidade para análises, 72% não foram agrupados e os demais formaram contigs compostos por 2 a 9 reads (Tabelas 2 e 3). O índice de novidade das bibliotecas encontra-se em 86,5%.

Tabela 1. Número de clones das bibliotecas nos acessos sexual (B105) e apomítico (B30), nos estágios de diferenciação do saco embrionário de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (IV) analisados em bancos de dados não redundante BLASTX e BLASTN. Foram consideradas apenas as seqüências que apresentaram e-value menor que 10^{-5} .

	BLASTX	BLASTN	No HITS	Total
B030 IeII	631	822	28	1425
B030 IV	47	67	61	175
B105 IeII	71	92	112	205
B105 IV	75	80	28	127

Tabela 2. Número de clones seqüenciados das bibliotecas nos acessos sexual (B105) e apomítico (B30), nos estágios de diferenciação do saco embrionário de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (IV).

	B030 IeII	B030 IV	B105 IeII	B105 IV	Total
clones seqüenciados	2.208	288	288	192	2.976
clones válidos	1.647	196	215	140	2.198
(% do total inicial)	(74,6%)	(68%)	(74,7%)	(72,9%)	(73,9%)
contigs	156	20	6	11	240
singlets	1.269	155	199	116	1.592

Tabela 3. Composição e número dos clusters das bibliotecas dos acessos sexual (B105) e apomítico (B30), nos estágios de diferenciação do saco embrionário de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (IV).

	1	2	3	4	5	6	7	9
	read	reads	reads	reads	reads	reads	reads	reads
B030	1269	120	20	8	6	-	1	1
IeII								
B030 IV	155	19	1	-	-	-	-	-
B105	199	5	-	-	-	1	-	-
IeII								
B105 IV	116	9	2	-	-	-	-	-

4.2. Identificação de genes do tipo MADS-Box nas bibliotecas

Foram identificados na biblioteca de cDNA de ovários de *Brachiaria brizantha*, sete contigs com grande similaridade com genes da família MADS-Box. Destes, foram selecionados dois contigs, 119 e o 38. O read mais representativo que compõe o contig 119 é aquele denominado B105IV001G03 na biblioteca. O contig 38 possui B30IeII001G05 como read mais representativo nas bibliotecas construídas até o momento.

O contig 119 possui 916 pares de base e 302 resíduos de aminoácidos deduzidos. A seqüência apresentou similaridade entre 82% e 89% tanto pelo BLASTN quanto pelo BLASTX com as seguintes seqüências depositadas no banco de dados não redundante do NCBI: *HvAGL9* (gi: 44888605) de *Hordeum vulgare*; m6 (gi: 29372767) de *Zea mays*; *PCO155219* (gi:21207409) de *Zea mays*.

O contig 38 possui 1159 pares de base e 384 resíduos de aminoácidos deduzidos e apresentou similaridade entre 83% e 95% com as seguintes seqüências: *ZAG3* (gi: 939779) e *ZAG5* (gi: 939781) de *Zea mays* e *HvAGL6* (gi: 44888603) de *Hordeum vulgare* no BLASTN e BLASTP.

4.3. Reverse Transcriptase - PCR (RT-PCR)

As reações foram feitas com 20, 24, 28 e 32 ciclos. Foram considerados para as análises os ciclos 28 para o contig 38 e o 32 para contig 119 a fim de não atingir o ponto de saturação das reações. Utilizou-se como controle positivo o gene da seqüência de ubiquitina obtida nas bibliotecas de cDNA de ovários de *B. brizantha*. A densidade de pontos das bandas resultantes para o contig 38 após eletroforese em gel de agarose (Figura 11) medida no densitômetro Zero-Dscan (Scanalytics®) (Tabela 4) foi menor em ovários em megasporogênese (IeII) de *B. brizantha* apomítica em relação a ovários em megagametogênese (IV) de *B. brizantha* apomítica e sexual e em ovários em megasporogênese *B. brizantha* sexual. Nas mesmas condições experimentais não foi observada amplificação em raiz e antera para o gene de interesse. As reações para o contig 38 foram realizadas com os iniciadores 1 e 2 (Figura 8B).

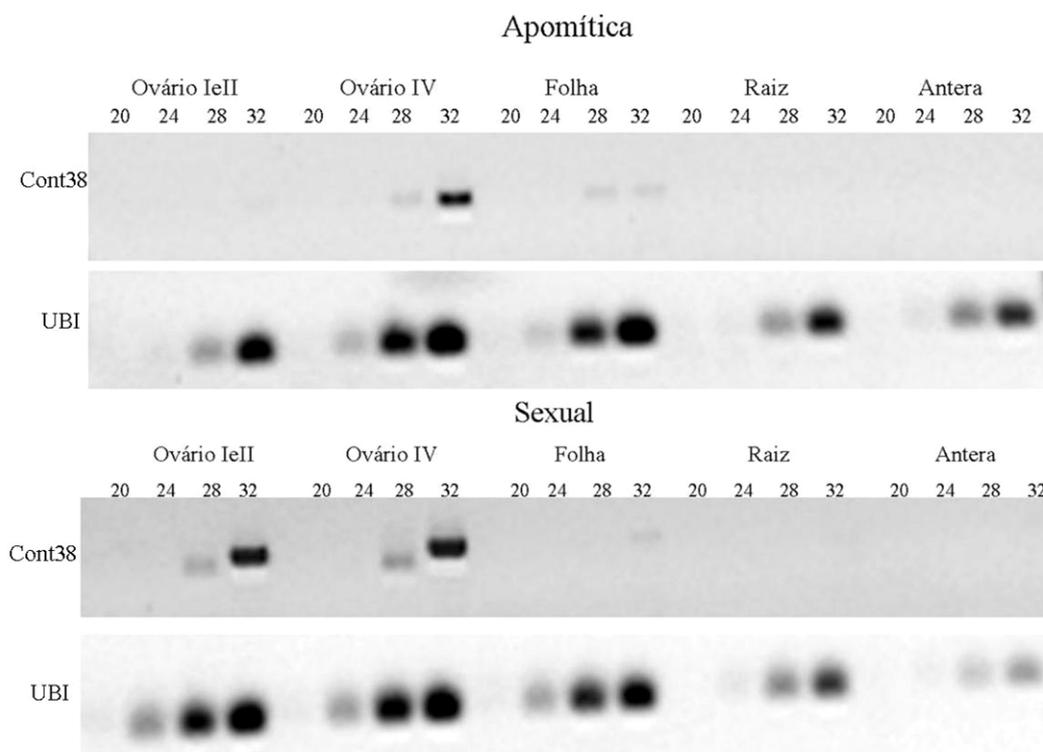


Figura 11. Imagem invertida da eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de amplificação por RT-PCR feita com cDNA de ovário, folha, raiz e antera. As reações foram feitas com 20, 24, 28 e 32 ciclos de amplificação. Utilizou-se material de plantas apomíticas e sexuais. Reações das seqüências do contig 38 (cont 38) e ubiquitina (UBI) foram feitas nas mesmas condições.

Em relação ao contig 119, a amplificação foi maior em ovários de plantas sexuais. Não se observou expressão em folha, mas houve amplificação do gene em antera da planta apomítica (Figura 12 e Tabela 5). Os valores obtidos nas análises do densitômetro Zero-Dscan (Scanalytics[®]) foram normalizados com as amplificações de gene constitutivo de ubiquitina. As reações para o contig 38 foram realizadas com os iniciadores 6 e 7 (Figura 8B).

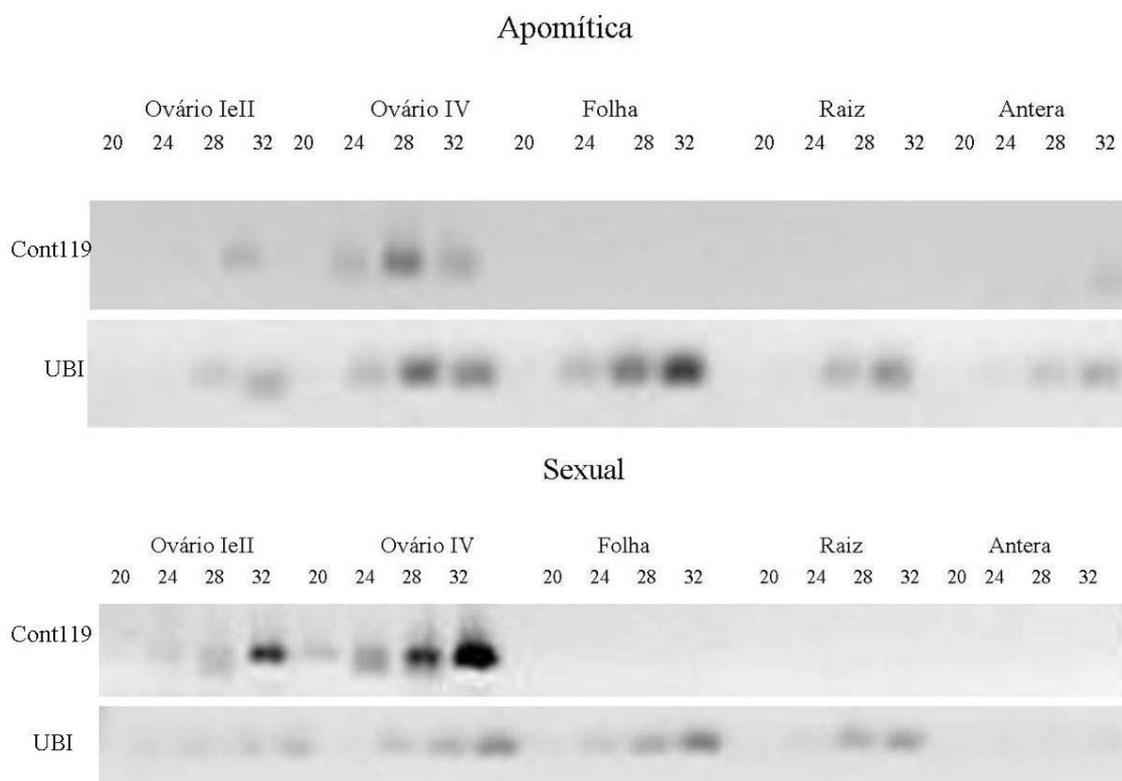


Figura 12. Imagem invertida da eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de amplificação por RT-PCR feita com cDNA de diversos tecidos. As reações foram feitas com 20, 24, 28 e 32 ciclos de amplificação. Utilizou-se material de plantas apomíticas (B30) e sexuais (B105). Reações das seqüências do contig119 (cont119) e ubiquitina (UBI) foram feitas nas mesmas condições.

Tabela 4. Relação dos níveis de expressão do contig 38 no ciclo 28 analisados no programa Zero-Dscan (Scanalytics®) na RT-PCR em ovários de diferentes plantas e em diferentes estágios de desenvolvimento. A: corresponde às palavras escritas em negrito e B em itálico.

Relação <i>A/B</i>	<i>APO-</i> <i>Esporogênese</i> <i>(B30IeII)</i>	<i>SEX</i> <i>Esporogênese</i> <i>(B105IeII)</i>	<i>SEX</i> <i>Gametogênese</i> <i>(B105IV)</i>
APO- Gametogênese (B30IV)	70,5	5,96	3,26
SEX Esporogênese (B105IeII)	11,83	-	-
SEX Gametogênese (B105IV)	21,66	1,83	-

Tabela 5. Relação dos níveis de expressão do contig 119 no ciclo 32 analisados no programa Zero-Dscan (Scanalytics®) na RT-PCR em ovários de diferentes plantas e em diferentes estágios de desenvolvimento. A: corresponde às palavras escritas em negrito e B em itálico.

Relação <i>A/B</i>	<i>APO-</i> <i>Esporogênese</i> <i>(B30IeII)</i>	<i>APO-</i> <i>Gametogênese</i> <i>(B30IV)</i>	<i>SEX</i> <i>Gametogênese</i> <i>(B105IV)</i>
APO- Esporogênese (B30IeII)	-	1,196	-
SEX Esporogênese (B105IeII)	11,295	13,503	0,66
SEX Gametogênese (B105IV)	17,185	20,546	-

Os produtos da RT-PCR dos ovários foram transferidos para uma membrana de Nylon Hybond™-N e hibridizados contra as seqüências dos reads mais representativos de cada contig marcadas radiotivamente (Figura 13).

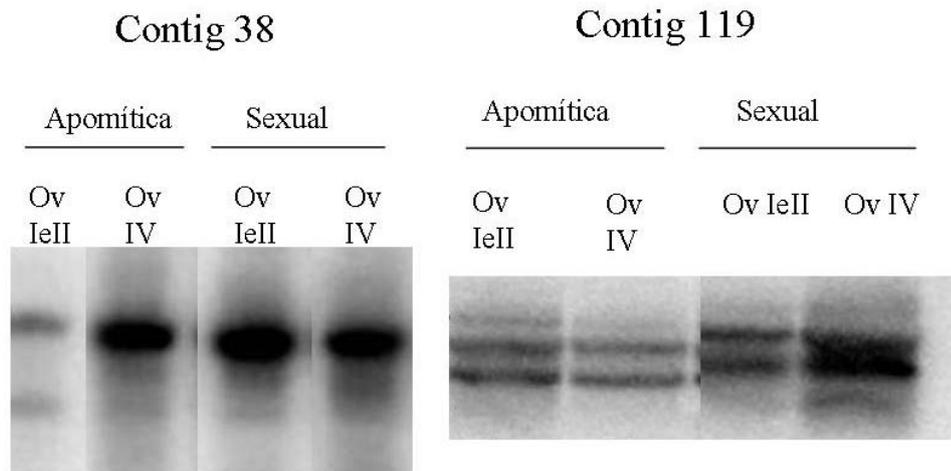


Figura 13. *Southern-blot* do produto da RT-PCR de ovários (Ov) em megasporogênese (IeII) e megagametogênese (IV) de *B. brizantha* apomítica e sexual.

4.4. Análise de restrição de DNA genômico e *Southern-blot*

O DNA genômico de *B. brizantha* apomítica e sexual foi digerido com as enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* e *SacI* (Figura 14).

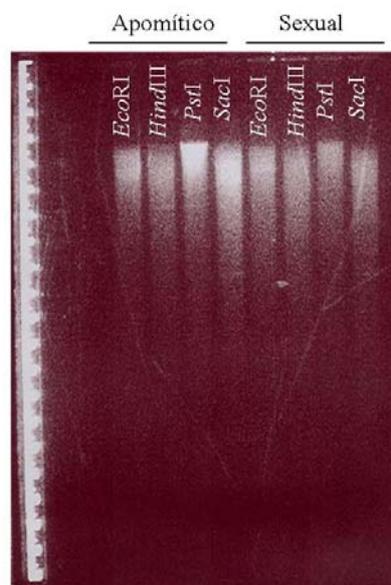


Figura 14. Perfil de restrição do DNA genômico de *B. brizantha* apomítica e sexual com as enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* e *SacI*.

Foram detectadas mais de uma banda no DNA genômico de *B. brizantha* apomítica e sexual. As sondas utilizadas nos experimentos foram amplificadas a partir da

seqüência mais representativa de cada contig analisado e possuem o domínio conservado de MADS-Box (Figura 15).

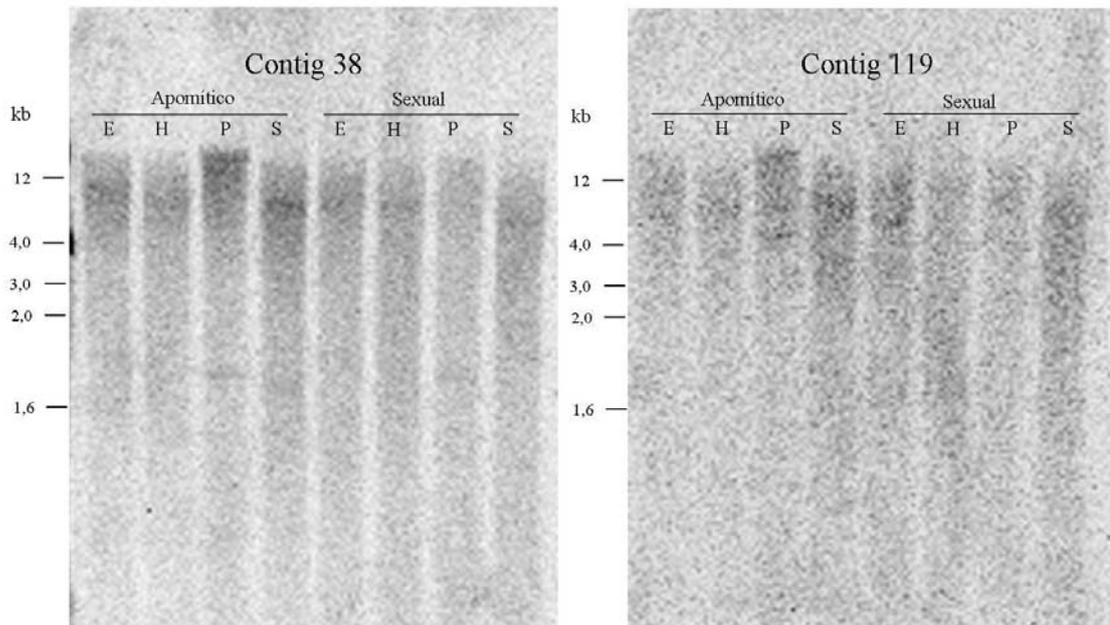


Figura 15. Southern blot de DNA genômico *Brachiaria brizantha* apomítica. E sexual para verificar a presença dos genes relacionados ao contigs 38 e 119. E: *EcoRI*, H: *HindIII*, P: *PstI* e S: *SacI*.

4.5. Ampliação do tamanho da seqüência de cDNA do contig 119

A seqüência do contig 119 foi ampliada em 38 pares de base (Figura 16) utilizando para a reação de amplificação iniciador 5, desenhado na seqüência m6 de *Zea mays* (milho) com similaridade de 90%, e o iniciador 7 (figura 8C).

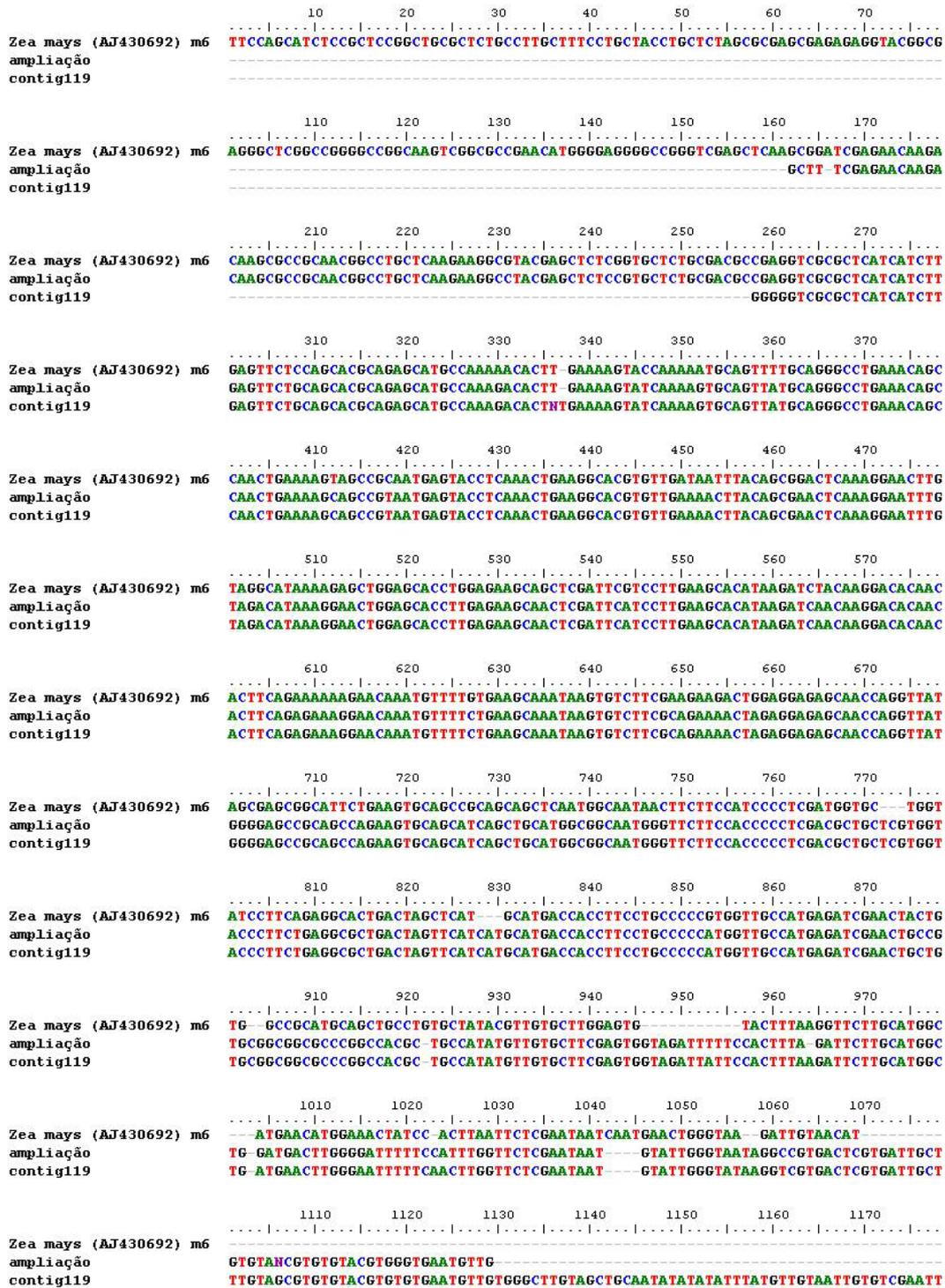


Figura 16. Alinhamento das seqüências do contig 119 de m6 de *Zea mays* e da ampliação do contig 119.

4.6. Análise de expressão dos contigs 119 e 38 em diferentes órgãos por qRT-PCR

A integridade do RNA total tratado com DNase e utilizado na síntese do cDNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio 0,1% (Figura 17).

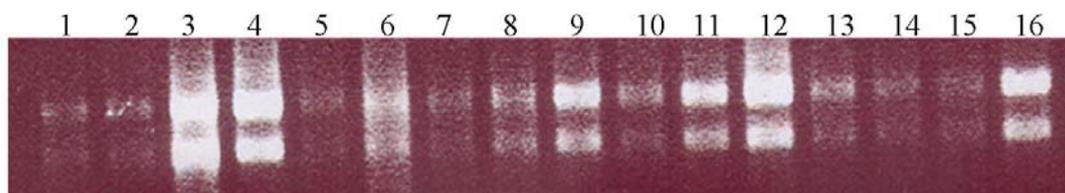


Figura 17. Perfil eletroforético de RNA total de diferentes órgãos de *B. brizantha* apomítica (B30) e sexual (B105). 1: B105ovI; 2: B105ovII; 3: B105ovIII; 4: B105ovVI; 5: B105antI; 6: B105antII; 7: B105antIII; 8: B105antVI; 9: B105raiz; 10: B30ovI; 11: B30ovII; 12: B30antI; 13: B30antII; 14: B30antIII; 15: B30antVI; 16: B30raiz. Não foram apresentados na figura RNA total de B30 folha, B30 ovIII, B30ov IV, B105 folha e de espiguetas de B30 e B105. ov: ovário; ant: antera.

As reações foram feitas em triplicatas e com duas amostras biológicas de cada cDNA. Análises de qRT-PCR dos contigs 38 e 119 mostraram maior amplificação em ovários, independentemente da origem de plantas apomíticas e sexuais, do que nos outros órgãos testados: antera, folha, raiz e espiguetas completa. Os iniciadores 3 e 4 foram utilizados para as análises referentes ao contig 38 (Figura 8B). Os iniciadores 7 e 8 foram utilizados para as análises referentes ao contig 119 (Figura 8C).

O contig 119 apresentou na planta apomítica amplificação significativamente maior em ovário no estágio III (início da megagametogênese) e na planta sexual, em ovário estágio II (final da megasporogênese) e estágio III (início da megagametogênese). O nível de amplificação do contig 119 foi bastante reduzido em plantas apomíticas em estágios de desenvolvimento dos ovários similares àqueles de plantas sexuais.

O contig 38 não apresentou diferença significativa de amplificação entre os órgãos florais de plantas apomíticas e sexuais. A amplificação foi maior em ovário nos diferentes estágios de desenvolvimento em relação à antera. Foi detectada menor amplificação em folha e raiz.

A amplificação da qRT-PCR foi conferida por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio 0,1% (Figura 18).

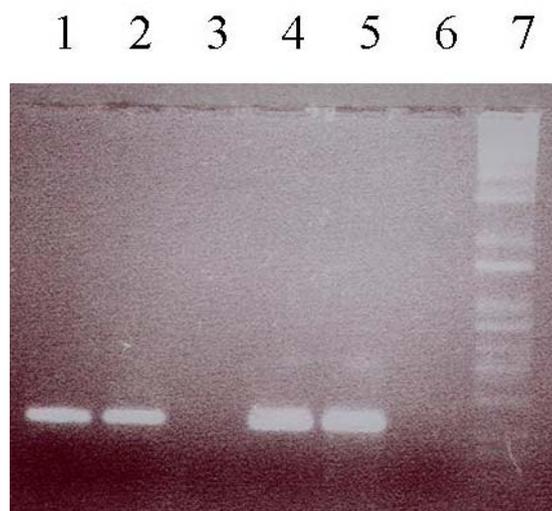


Figura 18. Perfil eletroforético da amplificação por qRT-PCR utilizando cDNA de diferentes órgãos para verificar o tamanho e o padrão do produto de amplificação. Amplificação utilizando iniciadores para o contig 38 em ovário estágio IV de *B. brizantha* apomítica (1) e sexual (2). Amplificação utilizando iniciadores para o contig 38 em raiz de *B. brizantha* apomítica (3). Amplificação utilizando iniciadores para o contig 119 em ovário estágio IV de *B. brizantha* apomítica (4) e sexual (5). 6: controle negativo. 7: 1 kb plus DNA LadderTM (Invitrogen[®]).

Os gráficos das análises de qRT-PCR apresentados na figura 19 referem-se a uma das amostras biológicas utilizadas. Os gráficos gerados com as duas amostras biológicas testadas para cada gene apresentaram o mesmo padrão de expressão.

4.7. Detecção de transcritos dos contigs 119 e 38 em tecidos reprodutivos por hibridização in situ.

Experimentos de hibridização in situ indicaram presença de transcritos em meristemas, ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais nos diversos estágios. No carpelo, na parede externa dos ovários, o sinal foi maior. Observou-se também sinal de hibridização nos micrósporos, grãos de pólen, e no endotécio de anteras e nos meristemas. O sinal de hibridização da sonda do contig 38 foi detectado também no coenócito em planta apomítica e sexual, nas células da micrópila nos estágios de megasporogênese (estágios I e II) da planta sexual e no saco embrionário dos ovários em megagametogênese (estágio IV) de plantas apomíticas. Não foi detectada a presença do transcrito no desenvolvimento do saco embrionário de ovários jovens (Figuras 20 A, B, E e F) de *B. brizantha* apomítica e sexual. O transcrito foi detectado nos sacos embrionários de ovários em megagametogênese (Figuras 20 C, D, G e H) e na parede do ovário em todos os estágios de desenvolvimento (Figuras 20 A a H) de *B. brizantha* apomítica e sexual. Não foi detectada presença do transcrito no saco embrionário no estágio IV da planta apomítica. O transcrito também foi detectado em endotécio, nas células que darão origem aos micrósporos, nos micrósporos e tapete de anteras jovens (Figuras 20 I, M, S, U e V) e no endotécio e grão de pólen das anteras maduras (Figuras 20 J, K, N, O, Q) de *B. brizantha* apomítica e sexual. Não foi detectada marcação nas extremidades do meristema floral e dos primórdios de lema e gluma das plantas sexuais e apomíticas (Figuras 20 L e P). A marcação foi mais fraca em ovários e meristemas em relação às anteras.

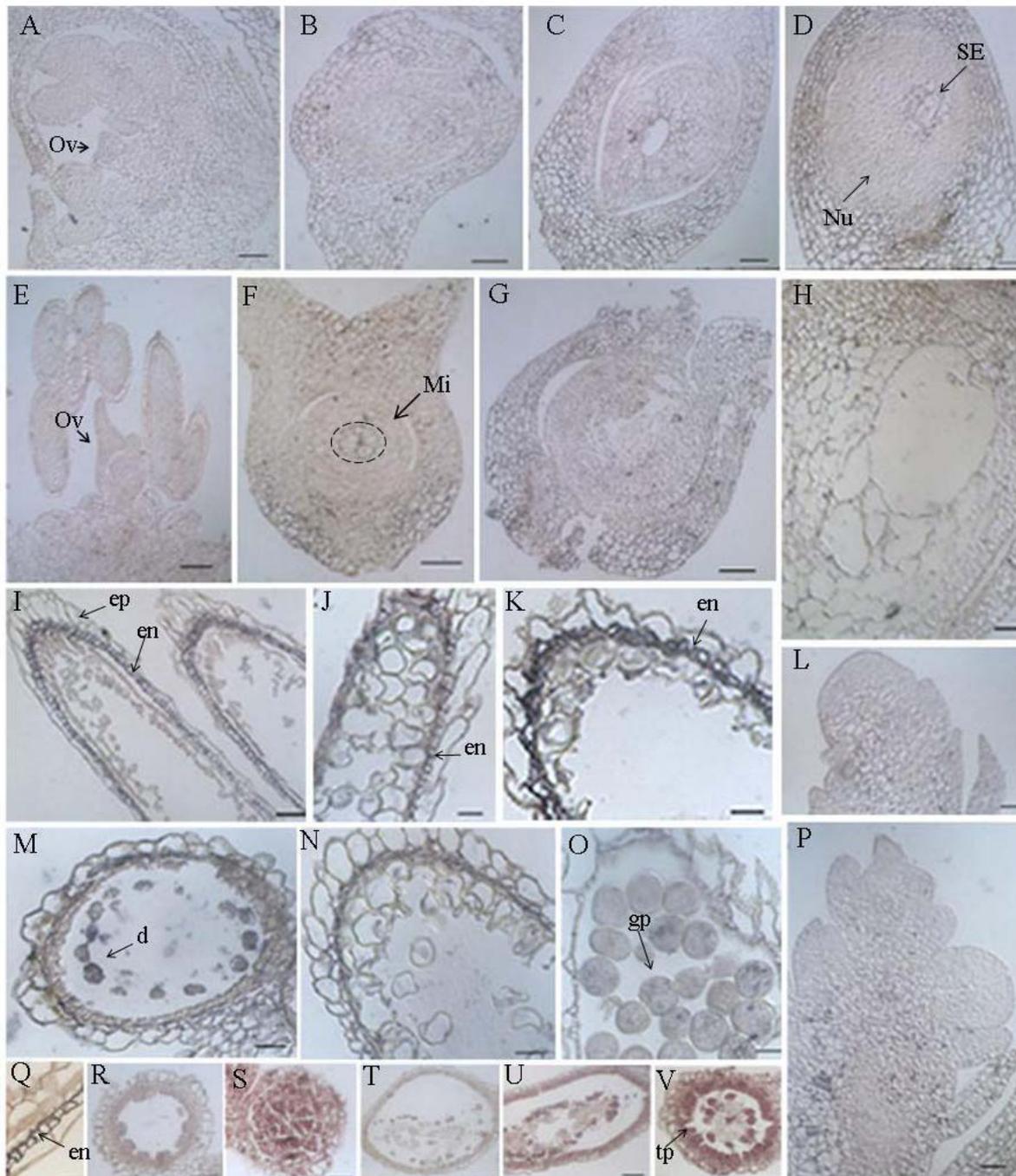


Figura 20. Padrão de expressão do gene referente ao contig 38 por hibridização in situ durante o desenvolvimento de ovários e anteras e no meristema floral de *B. brizantha* apomítica (A, B, C, D, I, J, K, L, R, S) e sexual (E, F, G, H, M, N, O, P, Q, T, U, V). R e T: corte transversal de antera hibridizado com sondas senso, nos quais não foi detectada marcação além da coloração de fundo. A a Q: secções de 3,5 μ m de material incluído em BMM. R a V: secções de 7,0 μ m de material incluído em parafina. A e E: corte longitudinal da flor hermafrodita no estágio I de desenvolvimento. B: corte longitudinal de ovário estágio II. C: corte longitudinal de ovário estágio III. D: corte longitudinal de ovário IV. Observa-se marcação no saco embrionário (SE), e não há

marcação no nucelo (nu) além da coloração de fundo. F: corte longitudinal de ovário estágio II. Marcação na parede do ovário e nas células da micrópila (mi). G: corte longitudinal de ovário estágio III. Marcação na parede do ovário. H: corte longitudinal de ovário estágio IV. Não há marcação no saco embrionário. I, J e K: corte longitudinal de antera estágios II (I), III (J) e IV (K). Endotécio (en) apresenta o sinal mais forte de hibridização. L e P: corte longitudinal de meristema. Não há marcação nas extremidades do meristema floral e primórdios de pálea e gluma. M: corte transversal de antera estágio II. Díades (d) apresentam o sinal mais forte de marcação. N e O: corte longitudinal de antera estágio III (N) e IV (O), marcação no endotécio (en) e pólen (p). Q: corte longitudinal de antera, sinal de hibridização no endotécio. S e V: corte transversal de anteras jovens. U: corte longitudinal de antera jovem. Barras: A a G, I, R, T, U, V: 13,35 μm . H, J a P, S: 6,67 μm . Q: 4,24 μm . ov: ovário, nu: nucelo; mi: micrópila; ep: epiderme; en: endotécio; mic: micrósporos; gp: pólen; tp: tapete; SE: saco embrionário; d: díades.

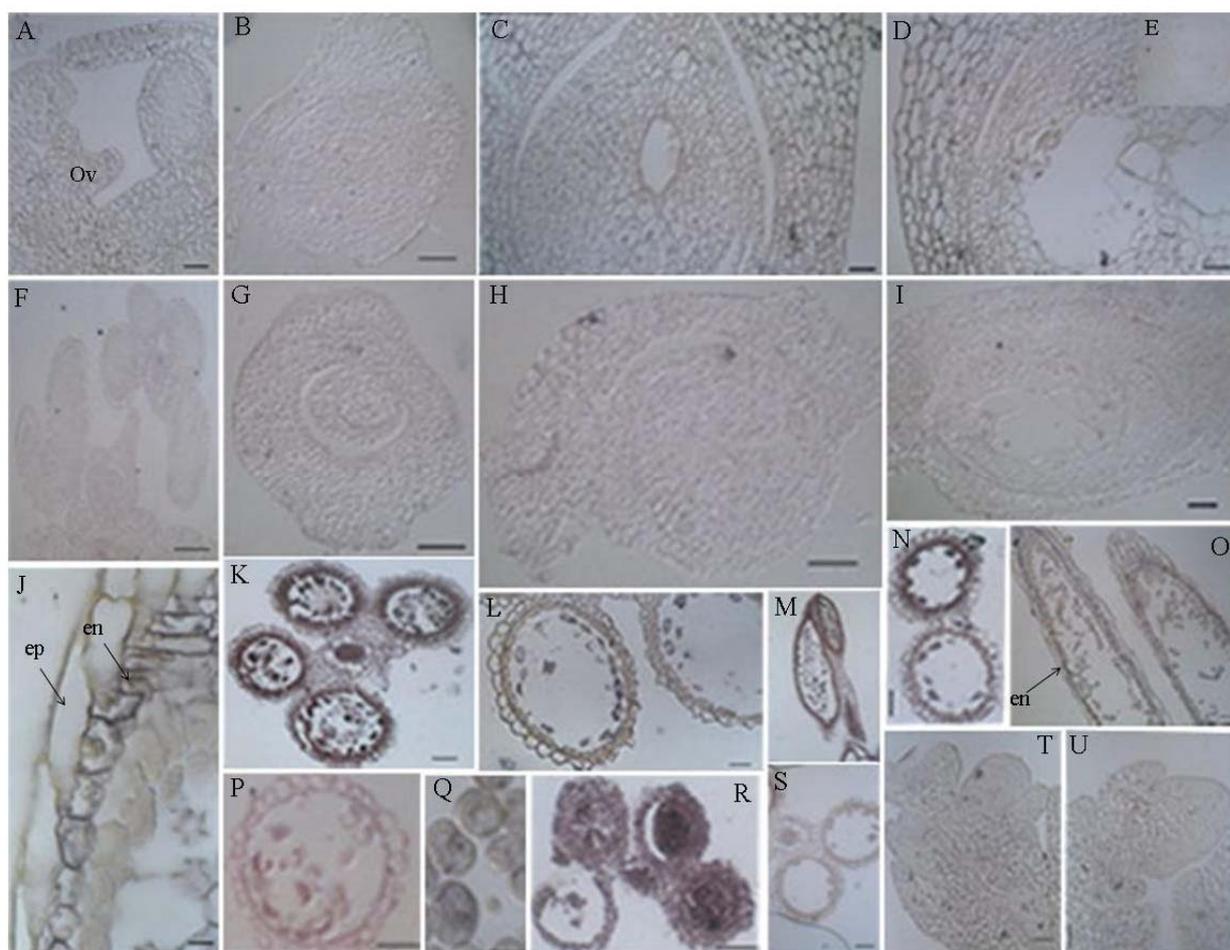


Figura 21. Padrão de expressão do gene referente ao contig 119 por hibridização in situ durante o desenvolvimento de ovários e anteras e no meristema floral de *B. brizantha* apomítica (A, B, C, D, E, J, N, R, S e U) e sexual (F, G, H, I, K, L, M, O, P, Q e T). De A a J, L, O, Q, T e U: secções de 3,5 µm de material incluído em BMM. K, M, N, P, R e S: secções de 7 µm de material incluído em parafina. A e F: corte longitudinal de flor hermafrodita no estágio I de desenvolvimento. B e G: leve marcação no corte longitudinal de ovário estágio II. C e D: Marcação mais forte na parede do ovário nos cortes longitudinais de ovário estágio III (C) e ovário estágio IV (D). E: hibridização com a sonda senso em ovário estágio IV, corte longitudinal. H: ovário estágio III, corte longitudinal. I: ovário estágio IV, corte longitudinal. J: hibridização específica no endotécio de antera estágio II, corte longitudinal. K e N (corte transversal) e M (corte longitudinal): marcação mais forte nas células do tapete, endotécio e nas células que darão origem ao pólen. L: corte transversal de antera estágio II, células que darão origem aos micrósporos apresentam marcação mais forte. O: corte longitudinal de antera estágio II, endotécio apresenta a marcação mais forte. P e S: hibridização com a sonda senso em antera, corte transversal, onde não observa-se marcação, além da coloração de fundo. Q: marcação no grão de pólen. R: marcação em antera, corte transversal. T e U: corte longitudinal de meristema floral. Barras: A, C, D, L, Q, T, U : 6,67 µm; B, E, G, H, I, K, N, O, P, R, S: 13,35 µm; F e M: 26,7 µm; J: 2,67 µm. ov: ovário; ep: epiderme; en: endotécio; tapete: tp; gp: grão de pólen.

O sinal de hibridização do transcrito correspondente ao contig 119 foi mais fraco em relação à hibridização referente ao contig 38. A marcação foi mais forte na parede dos ovários nos estágio III e IV de desenvolvimento de *B. brizantha* apomítica (Figuras 21 C, D). Não foi possível detectar sinal de marcação no ovário de plantas sexuais (Figuras 21 F, G, H e I) e nos sacos embrionários de plantas apomíticas e sexuais, além da coloração de fundo. O sinal de hibridização de anteras das plantas apomíticas e sexuais foi semelhante ao observado com o contig 38. Observou-se marcação nas células que darão origem aos micrósporos, no endotécio, no tapete e nos grãos de pólen (Figuras 21 J, K, L, M, N, O, Q, R). A hibridização não foi detectada nas extremidades do meristema floral, e primórdios de lema e gluma (Figura 21 T e U). Um resumo dos resultados das hibridizações dos ovários de *B. brizantha* está apresentado no esquema na figura 22.

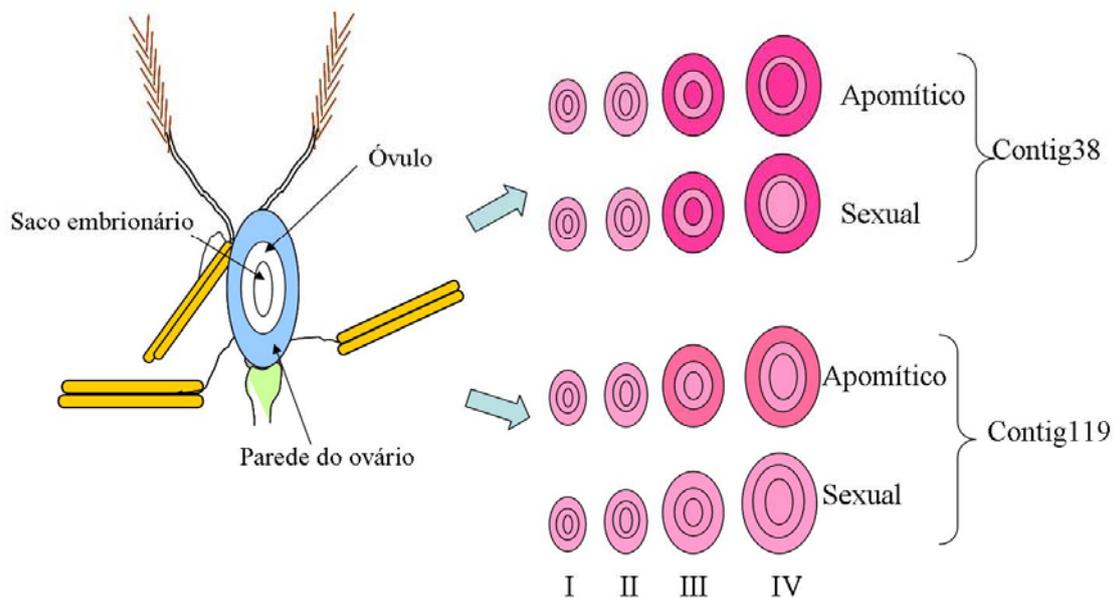


Figura 22. Esquema de localização dos transcritos dos genes referentes aos contig 38 e 119 em ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual nos estágios de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (III e IV). O matiz mais escuro representa sinal de hibridização mais forte.

4.8. Análise filogenética das seqüências dos contigs 38 e 119

Inicialmente, as seqüências de *B. brizantha* em estudo foram alinhadas somente com seqüências do tipo MADS de *Arabidopsis thaliana*. Foram selecionadas as seqüências dos grupos MIKC, M_α, M_β, M_γ, M_δ para alinhar com as seqüências contig 38 e 119. A árvore filogenética resultante do alinhamento dos 60 primeiros resíduos de aminoácidos dessas seqüências protéicas demonstrou que os contigs 38 e 119 pertencem ao grupo MIKC (Figura 23 A). Em seguida a análise filogenética foi feita com os 50 primeiros resíduos de aminoácidos pertencentes ao domínio MADS das seqüências do grupo MIKC de *Oryza sativa*, *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana* alinhadas com as seqüências dos contig 38 e 119 de *B. brizantha* (Figura 23 B). O resultado mostrou que a seqüência do contig 38 de *B. brizantha* é próxima da seqüência de *AGL6* e o contig 119 de *SEPPALATA2* de *Arabidopsis thaliana*. As seqüências em estudo são também próximas de seqüências ortólogas de monocotiledôneas.

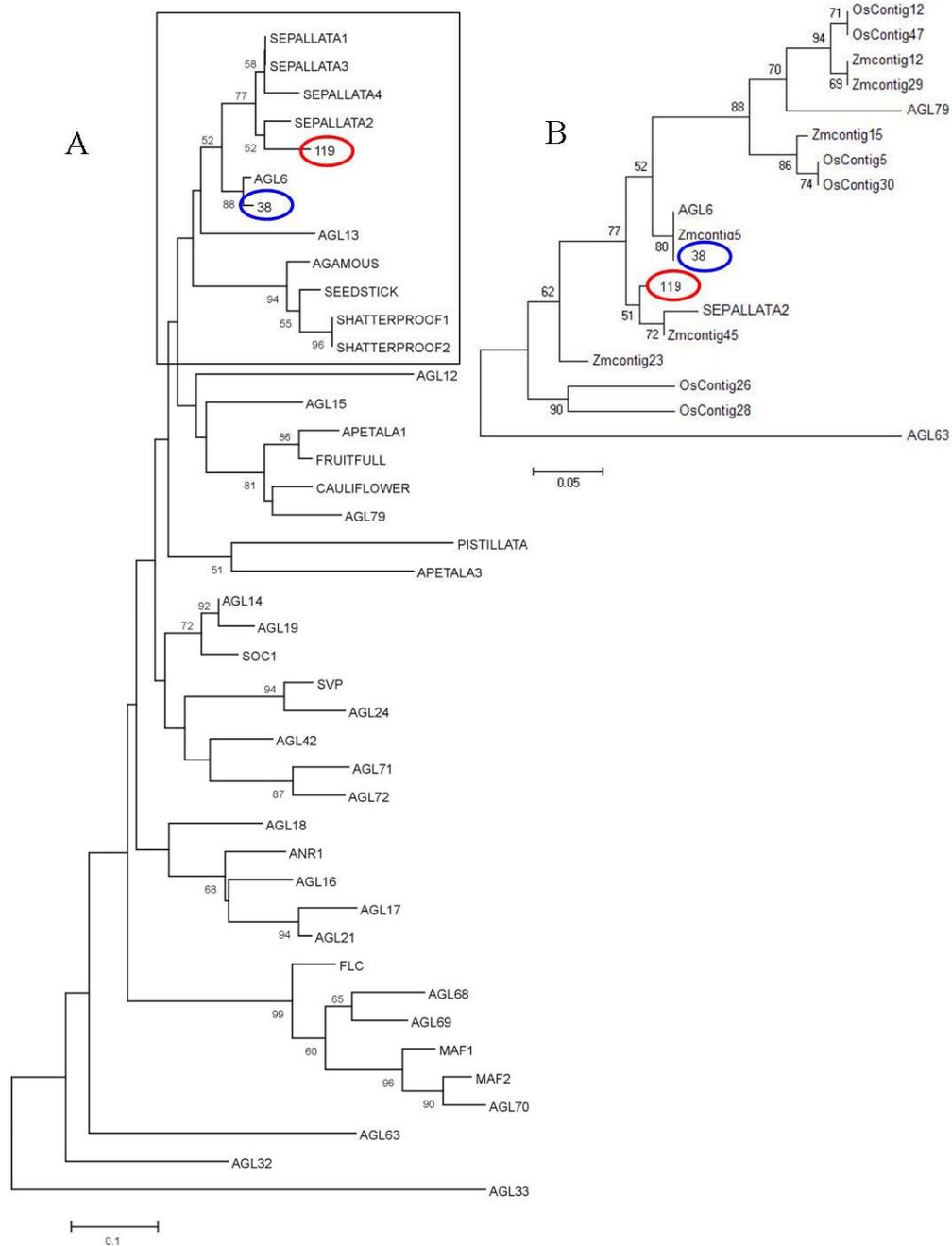


Figura 23. A: árvore filogenética com seqüências protéicas de MADS-Box do tipo MIKC de *Arabidopsis thaliana* e com seqüência protéica deduzida dos contigs 38 e 119. B: Árvore filogenética construída com seqüências protéicas do tipo MADS-Box de *A. thaliana*, *Zea mays* e *Oryza sativa* e com a seqüência protéica deduzida dos contigs 38 e 119. Os números próximos de cada nó representam os valores bootstrap. Apenas os valores maiores de 50 % são apresentados.

5. Discussão

As bibliotecas de cDNA de ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual em megasporogênese e megagametogênese apresentaram qualidade satisfatória. A construção da biblioteca de cDNA de ovários de *B. brizantha* em megasporogênese foi priorizada pelo interesse na detecção de seqüências responsáveis pela formação do saco embrionário tipo Panicum, presentes nas plantas apomíticas. Acredita-se que o início da regulação dos genes envolvidos na modulação da apomixia se dá neste estágio do desenvolvimento de ovários, correspondente ao início do aparecimento das iniciais apospóricas, no caso da aposporia (Rodrigues et al., 2003). A saturação dessa biblioteca, que ainda é de 86,5%, poderá apontar os genes responsáveis pelo início do desenvolvimento do saco embrionário tipo Panicum nestas plantas apomíticas. O estudo da expressão dos genes identificados em ovários de *B. brizantha* apomítica em megasporogênese permitirá análise comparativa nos demais estágios de desenvolvimento de ovários de plantas apomíticas e sexuais. Baseando-se nas características funcionais utilizadas pelo grupo de ortólogos de eucariotos (KOG) Silveira e colaboradores (2006) classificaram os unigenes nas 25 categorias existentes. As categorias mais abundantes pertencem ao grupo de proteínas relacionadas a modificações pós-traducionais e a grupo de proteínas cuja função ainda é pouco conhecida. Foram encontradas também proteínas envolvidas com processos do ciclo celular e meiose. A formação do saco embrionário do tipo Panicum depende da desregulação da meiose em plantas apomíticas, gerando um distúrbio do processo meiótico. Dessa forma a tétrade formada no gametófito feminino se degenera (Nogler, 1984a; Asker et al., 1992; Carman, 1997). Alves e colaboradores (2007) identificaram localização diferenciada do transcrito *BbrizREC* em *B. brizantha*. O transcrito *BbrizREC* está envolvido na recombinação dos cromossomos que ocorre durante a meiose e não foi encontrado nas iniciais apospóricas.

Neste trabalho nos interessamos pela análise da expressão de seqüências do tipo MADS-Box para investigar um possível envolvimento no modo de reprodução apomítico. Genes dessa família são responsáveis pela formação do órgão floral e embrião (Zhang et al., 1998; Causier et al., 2002) e podem estar envolvidos na diferenciação dos sacos embrionários do tipo Polygonum ou Panicum. Sacos embrionários do tipo Panicum estão presentes exclusivamente em plantas apomíticas. Nestas, a oosfera não reduzida irá desenvolver de modo autônomo o embrião. O núcleo

polar será fertilizado pelo núcleo espermático para desenvolver o endosperma. Não estão descritos ainda os genes envolvidos nestes processos de pseudogamia, fertilização e desenvolvimento autônomo do embrião. Foram selecionadas, nas bibliotecas construídas, duas seqüências do tipo MADS-Box – contigs 38 e 119 - para analisar o seu perfil de expressão em ovários, anteras e meristemas de plantas apomíticas e sexuais. A análise da expressão em diferentes tecidos dos órgãos florais indicará a possível função dos genes em estudo e a classificação no modelo ABCDE.

Buscou-se verificar a presença e a organização dos genes referentes aos contigs 38 e 119 no genoma de *B. brizantha*. Os resultados de *Southern blot* indicam que o gene está presente no genoma em poucas cópias, mas não são ainda conclusivos. É necessário realizar um experimento de *Southern* utilizando como sonda a região 3'UTR da seqüência de interesse para poder comparar com os resultados já obtidos e inferir o número de cópias existentes. Além disso, precisa-se conhecer a seqüência genômica em *B. brizantha* dos genes de interesse.

O estudo das bases moleculares envolvidas nas mudanças da morfologia reprodutiva de plantas tem sido um alvo cada vez maior para os estudiosos, pois o controle genético do desenvolvimento floral é regulado por relativamente poucos genes (Baum, 1998). A compreensão da evolução dos genes que controlam o desenvolvimento floral permitirá a inferência de divergências da origem do órgão floral e de forças seletivas que dirigiram mudanças evolutivas (Lawton-Rauh et al., 2000). Apesar de a apomixia ser observada nos sacos embrionários, a expressão de genes nas demais camadas da flor pode interferir na modulação dos genes do ovário (Koltunow et al., 2001). O desenvolvimento dos gametas, incluindo a meiose, é regulado por genes do gametófito em desenvolvimento e dos demais tecidos esporofíticos (Wilson et al., 2004). Especula-se que a degradação do nucelo é essencial para o surgimento do megásporo funcional e para o progresso da meiose (Yang et al., 2000).

As árvores filogenéticas construídas neste trabalho confirmam os dados das análises no banco de dados do NCBI e demonstram que a seqüência deduzida de proteínas do contig 38 de *B. brizantha* é evolutivamente próxima a *AGL6* e a do contig 119 a *SEPPALATA 2 (SEP2)* de *Arabidopsis thaliana*. Devido ao grau de similaridade e à proximidade filogenética das seqüências estudadas em relação aos genes descritos em *Arabidopsis* propõe-se que o contig 38 seja chamada de *BbrizAGL6* e o contig 119 de *BbrizSEP2*. As seqüências de *BbrizAGL6* e de *BbrizSEP2* são próximas filogeneticamente das seqüências ortólogas de monocotiledôneas. Monocotiledôneas e

dicotiledôneas apresentam diferenças morfológicas nos órgãos florais e alterações nos genes de controle do desenvolvimento, como MADS-Box, podem resultar em mudanças evolutivas na morfologia (Theissen et al., 1995).

Análises genéticas e do padrão de expressão de genes MADS-Box em gramíneas auxiliam na comparação dos órgãos florais de dicotiledôneas e monocotiledôneas e na determinação de equivalência entre esses órgãos (Schmidt et al., 1998). Mutantes de milho para o ortólogo *AP3* (*silky1*) (Ambrose, 2000) e de arroz para o ortólogo *PI* (*OSMADS4*) (Kang et al., 1998) exibiram fenótipos similares de MADS-Box da classe B em dicotiledôneas. A partir desses experimentos foi possível, então, deduzir que as lodículas em monocotiledôneas são homólogas às pétalas de dicotiledôneas e as páleas às sépalas. Os resultados encontrados nas análises em monocotiledôneas poderão contribuir na elucidação de questões ainda abertas tanto relacionadas à função de genes do tipo MADS-Box na reprodução de angiospermas quanto ao desenvolvimento reprodutivo de plantas sexuais e apomíticas.

BbrizSEP2 apresentou nas análises filogenéticas e no banco de dados do NCBI similaridade com *SEPPALATA 2* (*AGL4*) pertencente à classe E de MADS-Box, de *Arabidopsis thaliana* e com *AGL9* de *Hordeum vulgare*, que é ortólogo ao *AGL9* de *Arabidopsis thaliana*. De acordo com Mandel (1998), o *AGL9* de *A. thaliana* pode exercer função no estágio inicial de desenvolvimento da flor interagindo no meristema e na identidade floral. Além disso, pode atuar na regulação da expressão em pétalas, estames e carpelos.

O padrão de expressão de genes *SEPPALATA* e de seus ortólogos é bastante diversificado em diferentes espécies de plantas, mas pode ser verificado após a formação do meristema floral e antes da ativação de genes responsáveis pela formação da identidade de cada órgão floral. Transcrito de *AGL4* (*SEPPALATA2*) em *Arabidopsis thaliana* foi detectado por hibridização in situ em primórdios florais, pétalas, estames e carpelos e a expressão foi maior nos óvulos em desenvolvimento (Savidge et al., 1995). A expressão de *AGL2* em *Arabidopsis thaliana* (Flanagan et al., 1994) e de seu ortólogo, *FBP2*, em petúnia (Angenent et al., 1992), no entanto, diminui à medida que os órgãos florais amadurecem. Em monocotiledôneas, como o arroz, o padrão de expressão dos ortólogos de *SEPPALATA* (*SEP*) 2 e 3 é muito similar ao de *Arabidopsis*. Os transcritos são detectados nos primórdios do meristema floral e de estames, pistilos e lodículas (Pelucchi et al., 2002).

O transcrito do *BbrizSEP2* foi detectado por hibridização in situ em ovários, antera e meristema floral de *B. brizantha* apomítica e sexual. A marcação foi mais intensa nos ovários maduros e nas anteras. Esse gene apresentou, por qRT-PCR e RT-PCR, maior amplificação nas plantas sexuais e nos ovários em estágio de megagametogênese. A menor amplificação de *BbrizSEP2*, por qRT-PCR, foi encontrada principalmente no ovário estágio II (final da megasporogênese) nas plantas apomíticas em relação aos ovários nos demais estágios e nas plantas sexuais. O mesmo padrão de expressão não foi detectado nas hibridizações in situ, em que o sinal de marcação foi menor em ovários em megasporogênese de plantas apomíticas. Isso pode ser devido à presença do transcrito estar difundida por todo o ovário, sem estar concentrada em células específicas. Esse padrão de expressão, porém, não necessariamente indica uma ação também difusa do produto gênico.

Experimentos de imunolocalização e Maldi image poderão ser realizados para confirmar a localização da proteína de interesse. Experimentos de imunolocalização de proteína MADS-Box de *Petunia hybrida* (FBP1), *Malus domestica* Borkh – maçã – (MdMADS2) e *Arabidopsis thaliana* (AP3) associados à hibridização in situ demonstraram uma modulação pós-transcricional do gene. Em petúnia, a proteína FBP1 não foi detectada em primórdios de estames nos estágios tardios, onde a detecção de mRNA foi mais elevada em comparação a pétalas e estames nos demais estágios de desenvolvimento (Canas et al., 1994). MdMADS2 não foi detectada nos primórdios de estames e carpelos de maçã onde os níveis de mRNA foram consideráveis (Soon-Kee et al., 1999). Em plantas transgênicas de *Arabidopsis* que apresentavam expressão ectópica de *AP3*, o mRNA foi detectado em inflorescências e tecidos vegetativos e a proteína só foi detectada nos segundo, terceiro e quarto verticilos da flor (Jack et al., 1994). Posteriormente, foi demonstrado que o gene *PI* regula pós-transcricionalmente *AP3* (Krizek et al., 1996).

BbrizAGL6 apresentou similaridade, além de *AGL6* de *Arabidopsis thaliana*, com *ZAG3* e *ZAG5* de *Zea mays*. Esses genes estão relacionados com a formação de estames e carpelos (Mena et al., 1995; Ma et al., 1991). A detecção do transcrito de *BbrizAGL6* apresentou maior intensidade em relação ao *BbrizSEP2*, com a marcação mais intensa em ovários e anteras maduros. Experimentos de hibridização in situ permitiram a detecção do transcrito nos sacos embrionários nos estágio III e IV da planta apomítica e no estágio III da planta sexual. Observou-se, então, uma discreta mudança da localização do transcrito. A expressão não foi diferenciada nas plantas apomíticas e

sexuais por qRT-PCR, porém, a RT-PCR indicou menor expressão do gene nos ovários em megasporogênese da planta apomítica. A razão dos valores de expressão em ovário em megagametogênese sobre o de ovários em megasporogênese de plantas apomíticas obtidos no programa Zero-Dscan (Scanalytics®) foi 70,5 (Tabela 4). Isso pode ser devido ao fato de as seqüências amplificadas na RT-PCR e na qRT-PCR não serem idênticas. Na RT-PCR a seqüência possui aproximadamente 1kb e o iniciadores foram desenhados nas regiões 5' e 3'- UTR. Na reação de qRT-PCR, os iniciadores foram desenhados somente na região 3'-UTR.

Na análise da expressão de genes da família MADS-Box deve ser considerada a presença de domínios muito conservados entre os diferentes grupos para que os resultados representem o gene alvo de estudo escolhido e não um conjunto de vários genes. Por outro lado, os *reads* de uma biblioteca de cDNA podem compor diferentes contigs, dependendo dos parâmetros usados para sua montagem. A região menos conservada dos genes corresponde ao 3'UTR. No entanto, no caso de *BbrizAGL6*, essa região, apesar de ser a menos conservada, foi encontrada em mais de um *read* da biblioteca. Alguns desses *reads* apresentavam uma seqüência adicional de 16 nucleotídeos. Os *reads*, então, não representavam uma única seqüência. Ao aumentar o número de seqüências da biblioteca, os *reads*, que antes faziam parte do *BbrizAGL6*, passaram a pertencer a outros *contigs*, mantendo similaridade com as mesmas seqüências tipo MADS-Box. A presença desta região em diferentes grupos de genes pode ter ocasionado a amplificação e a hibridização de mais de um gene em qRT-PCR e na hibridização in situ, respectivamente, interferindo no padrão de expressão observado. Dessa forma, a seqüência amplificada por RT-PCR foi mais específica. Para aumentar a possibilidade de amplificação de uma seqüência única, os iniciadores deveriam estar desenhados na região que apresentava a diferença de 16 nucleotídeos. No entanto, a seqüência desta região só foi confirmada após realização dos experimentos.

O padrão de expressão de *BbrizAGL6* foi semelhante ao observado com seus genes ortólogos. A expressão de *ZAG3* foi detectada apenas no carpelo de *Zea mays*, não apresentando expressão em estames. Além disso, foram encontrados níveis altos de mRNA em órgãos florais estéreis de amostras masculinas e femininas (Mena et al., 1995). A detecção de mRNA de *OMADS1* de orquídea (*Oncidium* Gower Ramsey), ortólogo de *AGL6* de *Arabidopsis thaliana*, foi observada no meristema apical, labelo e no carpelo da flor. A expressão ectópica deste gene em tabaco gerou redução do tamanho da planta, florescimento precoce e perda da determinação da inflorescência

(Hsu et al., 2003). Isso sugere que este gene também está envolvido na identidade do meristema assim como *BbrizAGL6*. Em arroz, a sequência ortóloga ao gene *AGL6*, *OsMADS6*, assim como em *Arabidopsis* foi detectada nas flores em desenvolvimento e principalmente no carpelo (Pelucchi et al., 2002). Ainda não foi encontrada função para o gene *AGL6* de *Arabidopsis thaliana*.

A menor expressão de *BbrizAGL6* e *BbrizSEP2* em ovários em megasporogênese observada por hibridização in situ e RT-PCR, além de qRT-PCR para o gene *BbrizSEP2*, pode significar repressão do gene no momento onde estão relatados eventos diferenciais de desenvolvimento celular como a interrupção da meiose ou degeneração da tétrade e a diferenciação de iniciais apospóricas em *B.brizantha* (Araújo et al., 2000b). A aposporia como resultado da expressão precoce e ectópica de genes envolvidos na formação do saco embrionário é uma hipótese bastante atrativa, pois a iniciação do saco embrionário é precoce (Carman, 2001; Koltunow, 1993).

Observou-se também, por hibridização in situ, expressão maior na parede dos ovários em megagametogênese em relação ao saco embrionário.

A repressão do gene e a discreta mudança de localização do mRNA em ovários apomíticos e sexuais também foram observados com um gene ortólogo ao DEFICIENS, MADS-Box da classe B, em *Hieracium*. Esse gênero, assim como em *Brachiaria*, apresenta plantas que se reproduzem por apomixia do tipo apospórica (Guerin et al., 2000). Essa modulação de genes MADS-Box em espécies que apresentam reprodução apomítica pode ser consequência do início da apomixia ou facilitador do processo de eventos apomíticos (Guerin et al., 2000). Esses dados fornecem suporte para a hipótese de que a apomixia é um resultado da desregulação da reprodução sexual (Koltunow, 1993; Ozias-Akins, 2006; Albertini et al., 2005; Albertini et al., 2004).

No caso da apomixia os genes MADS-Box podem não ser os responsáveis diretos pelo fenótipo, mas, atuar na regulação de outros genes envolvidos na formação do órgão floral. A construção 35S:*OMADS1* em *A. thaliana* transgênica demonstrou ativação de genes envolvidos com florescimento como *FT*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)* e genes relacionados à identidade do meristema floral como *LEAFY (LFY)* e *APETALA1 (AP1)*(Ma et al., 1991; Hsu et al., 2003).

6. Conclusão

BbrizAGL6 e *BbrizSEP2* pertencem à família MADS-Box e apresentam modulação da expressão em plantas apomíticas e sexuais. Os resultados indicam repressão do gene em ovários em megasporogênese de *B. brizantha* apomítica. A expressão foi maior na parede dos ovários em relação aos sacos embrionários. Utilizando-se das análises obtidas neste trabalho e de dados já publicados na literatura, pode-se sugerir que os genes em estudo estão envolvidos na identidade do órgão floral e na identidade do meristema de *Brachiaria*. Embora os resultados de RT-PCR e qRT-PCR tenham apontado modulação dessas seqüências em relação à apomixia e sexualidade, os resultados de hibridização *in situ* não corroboram essa hipótese. Esses dados de localização do transcrito, entretanto, não invalidam os experimentos anteriores. Novas análises em diferentes estágios de desenvolvimento dos meristemas florais e estudos com as proteínas traduzidas pelas seqüências de interesse devem ser conduzidos.

7. Perspectivas

Pretende-se realizar experimentos de imunolocalização das proteínas analisadas neste trabalho para verificar se a localização do mRNA coincide com a localização da proteína. Análises em mutantes em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* são necessárias para verificar se há resgate do fenótipo e, assim, confirmar se *BbrizAGL6* e *BbrizSEP2* são ortólogos de *AGL6* e *SEP2*, respectivamente. Experimentos de RNAi podem ser realizados também para verificar o fenótipo causado pela ausência do transcrito nas plantas.

8. Referências Bibliográficas

- Abraham, A.; Mathew, P.M. Cytology of coconut endosperm. **Annals of Botany**, v.27, n.107, p. 505-513, 1963.
- Adam, H.; Jouannic, S.; Morcillo, F.; Richaud, F.; Duval, Y.; Tregear, J.W. MADS Box Genes in Oil Palm (*Elaeis guineensis*): Patterns in the Evolution of the SQUAMOSA, DEFICIENS, GLOBOSA, AGAMOUS, and SEPALLATA Subfamilies. **J Mol Evol.**, v.62, n.1, p.15-31, 2005.
- Ainsworth, C.; Crossley, S.; Buchanan-Wollaston, V.; Thangavelu, M.; Parker, J. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. **Plant Cell.**, v.7, n.10, p.1583–1598, 1995.
- Albertini, E.; Barcaccia, G.; Porceddu, A.; Sorbolini, S.; Falcinelli, M. Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic *Kentucky bluegrass* varieties. **Molecular Breeding**, v.7, n.4, p.293-300, 2001a.
- Albertini, E.; Marconi, G.; Barcaccia, G.; Raggi, L.; Falcinelli, M. Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. **Plant Molecular Biology**, v.56, p.879–894, 2004.
- Albertini, E.; Marconi, G.; Reale, L.; Barcaccia, G.; Porceddu, A.; Ferranti, F.; Falcinelli, M. SERK and APOSTART. Candidate Genes for Apomixis in *Poa pratensis*. **Plant Physiol.**, v.138, n.4, August 1, 2005, p.2185-2199, 2005.
- Albertini, E.; Porceddu, A.; Ferranti, F.; Reale, L.; Barcaccia, G.; Romano, B.; Falcinelli, M. Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation. **Sexual Plant Reproduction**, v.14, n.4, p.213-217, 2001b.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, p.403-410, 1990.
- Alvarez-Buylla, E.R.; Liljegren, S.J.; Pelaz, S.; Gold, S.E.; Burgeff, C.; Ditta, G.S.; Vergara-Silva, F.; Yanofsky, M.F. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. **The Plant Journal**, v.24, n.4, p.457-466, 2000.
- Alves, E.R.; Carneiro, V.T.C.; Dusi, D.M.A. In situ localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. **Protoplasma**, v.231, n.3, p.161-171, 2007.
- Ambrose, B.A.; Lerner, D.R.; Ciceri, P.; Padilla, C.M.; Yanofsky, M.F.; Schmidt, R.J. Molecular and genetic analyses of the *silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. **Mol Cell**, v.5, n.3, Mar, p.569-79, 2000.
- Angenent, G.C.; Busscher, M.; Franken, J.; Mol, J.N.; van Tunen, A.J. Differential expression of two MADS box genes in wild-type and mutant petunia flowers. **Plant Cell**, v.4, n.8, Aug, p.983-93, 1992.

Angenent, G.C.; Colombo, L. Molecular control of ovule development. **Trends in Plant Science**, v.1, n.7, p.228-232, 1996.

Angenent, G.C.; Franken, J.; Busscher, M.; van Dijken, A.; van Went, J.L.; Dons, H.J.; van Tunen, A.J. A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. **Plant Cell**, v.7, n.10, Oct, p.1569-82, 1995.

Antonius, K.; Nybom, H. Discrimination between sexual recombination and apomixis/automixis in a rubus plant breeding programme. **Hereditas**, v.123, n.3, p.205-213, 1995.

Araújo, A.C.G.; Alves, E.R.; Penteado, M.I.O.; Carneiro, V.T.C. **Analysis of apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae) endosperm**. XVIth International Congress on Sexual Plant Reproduction. Banff-Alberta, Canadá, 2000a. 79 p.

Araújo, A.C.G.; Mukhambetzhonov, 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, 2000b.

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**, v. 144, n 1-2, p.39-50, 2005.

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

Baum, D.A. The evolution of plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, n.1, p.79-86, 1998.

Becker, A.; Winter, K.U.; Meyer, B.; Saedler, H.; Theien, G. MADS-Box Gene Diversity in Seed Plants 300 Million Years Ago. **Mol Biol Evol**, v.17, n.10, October 1, 2000, p.1425-1434, 2000.

Bicknell, R.A.; Borst, N.K.; Koltunow, A.M. Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. **Heredity**, v.84, n.2, p.228-237, 2000.

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)⁺ containing RNA during female gametophyte development in *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. **Phytomorphology**, v.46, p.9-17, 1996.

Bowman, J. Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. **Journal of Biosciences**, v.22, n.4, p.515-527, 1997.

- Bowman, J. L.; Baum, S. F.; Eshed, Y.; Putterill, J. ; Alvarez, J. Molecular genetics of gynoecium development in Arabidopsis. *Curr Top Dev Biol*, v.45, p.155-205, 1999.
- Calderini, O.; Chang, S.; de Jong, H.; Busti, A.; Paolocci, F.; Arcioni, S.; de Vries, S.; Abma-Henkens, M.; Lankhorst, R.; Donnison, I.; Pupilli, F. Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.112, n.6, p.1179-1191, 2006.
- Canas, A.L.; Busscher, M.; Angenent, G.C.; Beltran, J.P.; Van Tunen, A.J. Nuclear localization of the petunia MADS box protein FBP1. **Plant Journal**, v.6, n.4, p.597-604, 1994.
- 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.
- Carman, J.G. The gene effect: genome collisions and apomixis. In: Y. Savidan, J. G. Carman and T. Dresselhaus (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. p.95-110. Mexico, 2001.
- Carneiro, V.T.C.; Dusi, D.M.A. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: V. T. C. Carneiro and D. M. A. Dusi (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p.47-65. 2004.
- Carneiro V.T.C.; Dusi D.M.A., Ortiz J.P.A. Apomixis: occurrence, applications and improvements. /In/ J.A.T. Silva, ed, **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and Tropical Issues**. Ikenobe, Japan: Global Science Books, v.01. p 659 p, 2006.
- Causier, B.; Kieffer, M.; Davies, B. Plant biology. MADS-box genes reach maturity. **Science**, v.296, n.5566, Apr 12, p.275-6, 2002.
- Chen, L.; Miyazaki, C.; Kojima, A.; Saito, A.; Adachi, T. Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). **J. Plant Physiol.**, v.154, p.55-62, 1999.
- Clayton, W.D.; Renvoize, S.A. **Genera graminum: Grasses of the world**. London, UK: Her Majesty's Stationery Office. 1986. 389 p.
- Coen, E.S.; Meyerowitz, E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, v.353, n.6339, p.31-37, 1991.
- Colombo, L.; Franken, J.; Koetje, E.; van Went, J.; Dons, H.J.; Angenent, G.C.; van Tunen, A.J. The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. **Plant Cell**, v.7, n.11, Nov, p.1859-68, 1995.

- Davies, B.; Egea-Cortines, M.; de Andrade Silva, E.; Saedler, H.; Sommer, H. Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. **Embo J**, v.15, n.16, Aug 15, p.4330-43, 1996.
- Devos, K.M. Updating the 'Crop Circle'. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, n.2, p.155-162, 2005.
- Dornelas, M.C.; Rodriguez, A.P.M. A genomic approach to elucidating grass flower development. **Genet. Mol. Biol.**, v.24, p.1-4, 2001.
- 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.
- Ebina, M.; Nakagawa, H.; Yamamoto, T.; Araya, H.; Tsuruta, S.-i.; Takahara, M.; Nakajima, K. Co-segregation of AFLP and RAPD markers to apospory in Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). **Grassland Science**, v.51, n.1, p.71-78, 2005.
- Egea-Cortines, M.; Saedler, H.; Sommer, H. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. **Embo J**, v.18, n.19, Oct 1, p.5370-9, 1999.
- Martínez, E.J., Urbani, M.H., Quarín, C.L., Ortiz, J.P.A. Inheritance of Apospory in Bahiagrass, *Paspalum Notatum*. **Hereditas**, v.135, n.1, p.19-25, 2001.
- Favaro, R.; Immink, R.G.; Ferioli, V.; Bernasconi, B.; Byzova, M.; Angenent, G.C.; Kater, M.; Colombo, L. Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein-protein interactions in monocot and dicot plants. **Mol Genet Genomics**, v.268, n.2, Oct, p.152-9, 2002.
- Fisher, M.J.; Kerridge, P.C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: J. W. Miles, B. L. Maass and C. B. d. Valle (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia, Campo Grande-Brasil: CIAT-Embrapa, v.1, 1996. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species, 288p.
- Flanagan, C.A.; Ma, H. Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene AGL2 in wild-type and mutant *Arabidopsis* flowers. **Plant Mol Biol.**, v.26, n.2, Oct, p.581-95, 1994.
- 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.
- Greco, R.; Stagi, L.; Colombo, L.; Angenent, G.C.; Sari-gorla, M.; Pe, M.E. MADS-box genes expressed in developing inflorescences of rice and sorghum. **Mol. Gen. Genetic**, v.253, p.615-623, 1997.

Grimanelli, D.; Leblanc, O.; Espinosa, E.; Perotti, E.; Gonzales de Leon, D.; Savidan, Y. Mapping diplosporous apomixis in tetraploid *Tripsacum*: one gene or several genes? **Heredity**, v.80, p.33-39, 1998.

Grossniklaus, U. From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. In: Y. Savidan, J. G. Carman and T. Dresselhaus (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.; Nogler, G.A.; van Dijk, P.J. How to Avoid Sex: The Genetic Control of Gametophytic Apomixis. **Plant Cell**, v.13, n.7, July 1, 2001, p.1491-1498, 2001.

Gualtieri, G.; Conner, J.A.; Morishige, D.T.; Moore, L.D.; Mullet, J.E.; Ozias-Akins, P. A Segment of the Apospory-Specific Genomic Region Is Highly Microsyntenic Not Only between the Apomicts *Pennisetum squamulatum* and Buffelgrass, But Also with a Rice Chromosome 11 Centromeric-Proximal Genomic Region. **Plant Physiol.**, v.140, n.3, March 1, 2006, p.963-971, 2006.

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, n.6, p.914-920, 2000.

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

Hardenack, S.; Ye, D.; Saedler, H.; Grant, S. Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. **Plant Cell**, v.6, n.12, Dec, p.1775-87, 1994.

Honma, T.; Goto, K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. **Nature**, v.409, n.6819, Jan 25, p.525-9, 2001.

Hsu, H.F.; Huang, C.H.; Chou, L.T.; Yang, C.H. Ectopic expression of an orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) AGL6-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.**, v.44, n.8, Aug, p.783-94, 2003.

Huang, X.; Madan, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, v.9, n.9, p.868-77, 1999.

Jack, T.; Fox, G.L.; Meyerowitz, E.M. *Arabidopsis* homeotic gene APETALA3 ectopic expression: Transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. **Cell**, v.76, n.4, p.703-716, 1994.

Jager, M.; Hassanin, A.; Manuel, M.; Le Guyader, H.; Deutsch, J. MADS-box genes in *Ginkgo biloba* and the evolution of the AGAMOUS family. **Mol Biol Evol.**, v.20, n.5, May, p.842-54, 2003.

Jang, S.; An, K.; Lee, S.; An, G. Characterization of tobacco MADS-box genes involved in floral initiation. **Plant Cell Physiol**, v.43, n.2, Feb, p.230-8, 2002.

- Kang, H.G.; Jeon, J.S.; Lee, S.; An, G. Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice plants. **Plant Mol Biol**, v.38, n.6, Dec, p.1021-9, 1998.
- Kanno, A.; Saeki, H.; Kameya, T.; Saedler, H.; Theissen, G. Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). **Plant Mol Biol**, v.52, n.4, Jul, p.831-41, 2003.
- Karia, C.T.; Duarte, J.B.; Araújo, A.C.G. Estratégias de desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. no Brasil. em prelo.
- Kater, M.M.; Dreni, L.; Colombo, L. Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot.**, v.57, n.13, October 1, 2006, p.3433-3444, 2006.
- Kaushal, P.; Malaviya, D. R.; Roy, A. K. Prospects for breeding apomictic rice: A reassessment. **Current Science**, v.87, n.3, p.292-296, 2004.
- Koltunow, A.; Johnson, S.; Lynch, M.; Yoshihara, T.; Costantino, P. Expression of rolB in apomictic *Hieracium piloselloides* Vill. causes ectopic meristems in planta and changes in ovule formation, where apomixis initiates at higher frequency. **Planta**, v.214, n.2, p.196-205, 2001.
- 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.; Grossniklaus, U. Apomixis: a developmental perspective. **Ann. Rev. Plant Biol.**, v.54, p.547-574, 2003.
- Koltunow, A.M.; Johnson, S.D.; Bicknell, R.A. Sexual and apomictic development in *Hieracium*. **Sexual Plant Reproduction**, v.11, n.4, p.213-230, 1998.
- Koltunow, A.M.; Johnson, S.D.; Bicknell, R.A. Apomixis is not developmentally conserved in related, genetically characterized *Hieracium* plants of varying ploidy. **Sexual Plant Reproduction**, v.12, n.5, p.253-266, 2000.
- Krahulcova, A.; Suda, J. A modified method of flow cytometric seed screen simplifies the quantification of progeny classes with different ploidy levels. **Biologia Plantarum**, v.50, n.3, p.457-460, 2006.
- Krizek, B.A.; Fletcher, J.C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. **Nat Rev Genet**, v.6, n.9, p.688-698, 2005.
- Krizek, B.A.; Meyerowitz, E.M. The *Arabidopsis* homeotic genes APETALA3 and PISTILLATA are sufficient to provide the B class organ identity function. **Development**, v.122, n.1, Jan, p.11-22, 1996.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jacobsen, I.; Nei, N. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0. Arizona: Pennsylvania and Arizona State University, University Park, Pennsylvania and Tempe, 2000.

- Laitinen, R.; Broholm, S.; Albert, V.; Teeri, T.; Elomaa, P. Patterns of MADS-box gene expression mark flower-type development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). **BMC Plant Biology**, v.6, n.1, p.11, 2006.
- Lawton-Rauh, A.L.; Alvarez-Buylla, E.R.; Purugganan, M.D. Molecular evolution of flower development. **Trends in Ecology & Evolution**, v.15, n.4, p.144-149, 2000.
- Leblanc, O.; Hernández, M.; Bello, S.; Garcia, V.; Bertaud, J.; Savidan, Y. Chromosome doubling in *Tripsacum*: the production of artificial, sexual tetraploid plants. **Plant Breeding**, v.114, p.226-230, 1995.
- Leseberg, C.H.; Li, A.; Kang, H.; Duvall, M.; Mao, L. Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. **Gene**, v.378, p.84-94, 2006.
- 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.
- Ma, H.; Yanofsky, M.F.; Meyerowitz, E.M. AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. **Genes Dev.**, v.5, n.3, March 1, 1991, p.484-495, 1991.
- Mandel, M.A.; Yanofsky, M.F. The *Arabidopsis* AGL9 MADS box gene is expressed in young flower primordia. **Sexual Plant Reproduction**, v.11, n.1, p.22-28, 1998.
- Masucci, J.D.; Rerie, W.G.; Foreman, D.R.; Zhang, M.; Galway, M.E.; Marks, M.D.; Schiefelbein, J.W. The homeobox gene GLABRA2 is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v.122, n.4, April 1, 1996, p.1253-1260, 1996.
- Matzk, F.; Hammer, K.; Schubert, I. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. **Sexual Plant Reproduction**, v.16, n.2, p.51-58, 2003.
- Matzk, F.; Meister, A.; Brutovska, R.; Schubert, I. Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. **The Plant Journal**, v.26, n.3, p.275-282, 2001.
- Matzk, F.; Meister, A.; Schubert, I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. **The Plant Journal**, v.21, n.1, p.97-108, 2000.
- 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. **Plant Cell**, v.17, n.1, January 1, 2005, p.13-24, 2005.
- Mena, M.; Ambrose, B.A.; Meeley, R.B.; Briggs, S.P.; Yanofsky, M.F.; Schmidt, R.J. Diversification of C-function activity in maize flower development. **Science**, v.274, n.5292, Nov 29, p.1537-40, 1996.

Mena, M.; Mandel, M.A.; Lerner, D.R.; Yanofsky, M.F.; Schmidt, R.J. A characterization of the MADS-box gene family in maize. **The Plant Journal**, v.8, n.6, p.845-854, 1995.

Miles, J.W.; Escandon, M.L. Further evidence on the inheritance of reproductive mode in *Brachiaria*. **Can. J. Plant Sci.**, v.77, p.105-107, 1997.

Miles, J.W.; Maass, B.L.; Valle, C.B.d. *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. Cali, Colombia: CIAT, v.1. 1996. 258 p,

Miles, J.W.; Valle, C.B.d. Assessment of reproductive behavior of interespecific *Brachiaria* hybrids. **Apomixis Newsl.**, v.3, p.9-10, 1991.

Naumova, T.N.; Osadchiy, J.V.; Sharma, V.K.; Dijkhuis, P.; Ramulu, K.S. Apomixis in plants: structural and functional aspects of diplospory in *Poa nemoralis* and *P. palustris*. **Protoplasma**, v.208, n.1, p.186-195, 1999.

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

Nogler, G.A. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus* V. Conclusions. **Bot. Helvet**, v.94, p.411-422, 1984b.

Noyes, R.D. Inheritance of apomeiosis (diplospory) in fleabanes (*Erigeron*, Asteraceae). **Heredity**, v.94, n.2, p.193-198, 2004.

Ortiz, J.P.A.; Pessino, S.C.; Leblanc, O.; Hayward, M.D.; Quarin, C.L. Genetic fingerprinting for determining the mode of reproduction in *Paspalum notatum*, a subtropical apomictic forage grass. **TAG**, v.95, p.850-856, 1997.

Ozias-Akins, P. Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.25, p.199-214, 2006.

Ozias-Akins, P.; Akiyama, Y.; Hanna, W.W. Molecular characterization of the genomic region linked with apomixis in *Pennisetum/Cenchrus*. **Functional & Integrative Genomics**, v.3, n.3, p.94-104, 2003.

Ozias-Akins, P.; Lubbers, E.L.; Hanna, W.W.; McNay, J.W. Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.85, p.632-638, 1993.

Ozias-Akins, P.; Roche, D.; Hanna, W.W. Tight clustering and hemizygoty 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.

Park, J.H.; Ishikawa, Y.; Yoshida, R.; Kanno, A.; Kameya, T. Expression of AODEF, a B-functional MADS-box gene, in stamens and inner tepals of the dioecious species *Asparagus officinalis* L. **Plant Molecular Biology**, v.51, n.6, p.867-875, 2003.

- Pelaz, S.; Ditta, G.S.; Baumann, E.; Wisman, E.; Yanofsky, M.F. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. **Nature**, v.405, n.6783, May 11, p.200-3, 2000.
- Pelaz, S.; Tapia-Lopez, R.; Alvarez-Buylla, E.R.; Yanofsky, M.F. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. **Current Biology**, v.11, n.3, p.182-184, 2001.
- Pelucchi, N.; Fornara, F.; Favalli, C.; Masiero, S.; Lago, C.; Pè, E.M.; Colombo, L.; Kater, M.M. Comparative analysis of rice MADS-box genes expressed during flower development. **Sexual Plant Reproduction**, v.15, n.3, p.113-122, 2002.
- Parenicova, L.; De Folter, S.; Kieffer, M.; Horner, D. S.; Favalli, C.; Busscher, J.; Cook, H. E.; Ingram, R. M.; Kater, M. M.; Davies, B.; Angenent, G. C. ; Colombo, L. Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World. *Plant Cell*, v.15, n.7, July 1, 2003, p.1538-1551, 2003.
- 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.; do Valle, C.B.; Evans, C.; Hayward, M.D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.94, n.3, p.439-444, 1997.
- Pinheiro, A.A.; Pozzobon, M.T.; Valle, C.B.; Penteadó, M.I.O.; Carneiro, V.T.C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants, using colchicine. **Plant Cell Reports**, v.19, n.3, p.274-278, 2000.
- Pnueli, L.; Abu-Abeid, M.; Zamir, D.; Nacken, W.; Schwarz-Sommer, Z.; Lifschitz, E. The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. **Plant J**, v.1, n.2, Sep, p.255-66, 1991.
- Polaquini, L.E.M.; Souza, J.G.; Gebara, J.J. Transformações técnico-podutivas e comerciais na pecuária de corte brasileira a partir da década de 90. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.1, p.321-327, 2006.
- 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*. **Sex Plant Reprod.**, v.13, n.5, p.243-249, 2001.
- 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.; Norrmann, G.A.; Espinoza, F. Evidence for autopolyploidy in apomictic *Paspalum rufum*. **Hereditas**, v.129, p.119-124, 1998.

- Reinheimer, R.; Pozner, R.; Vegetti, A.C. Inflorescence, spikelet, and floral development in *Panicum maximum* and *Urochloa plantaginea* (Poaceae). **Am. J. Bot.**, v.92, n.4, April 1, 2005, p.565-575, 2005.
- 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 and e. al (Ed.). **Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement**. Cali, Colombia e Campo Grande, Brasil. CIAT-EMBRAPA, 1996. p.1-15
- Riechmann, J.L.; Krizek, B.A.; Meyerowitz, E.M. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.10, May 14, p.4793-8, 1996.
- Riechmann, J.L.; Meyerowitz, E.M. Determination of floral organ identity by *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. **Mol Biol Cell**, v.8, n.7, Jul, p.1243-59, 1997.
- Roche, D.; Cong, P.; Chen, Z.; Hanna, W.W.; Gustine, D.L.; Sherwood, R.T.; Ozias-Akins, P. An apospory-specific genomic region is conserved between Buffelgrass (*Cenchrus ciliaris* L.) and *Pennisetum squamulatum* Fresen. **The Plant Journal**, v.19, p.203-208, 1999.
- Roche, D.; Conner, J.; Budiman, M.; Frisch, D.; Wing, R.; Hanna, W.; Ozias-Akins, P. Construction of BAC libraries from two apomictic grasses to study the microcolinearity of their apospory-specific genomic regions. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.104, n.5, p.804-812, 2002.
- 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.
- Rodriguez, A.P.M.; Guimarães, L.A.; Dusi, D.M.A.; Carneiro, V.T.C. Análise por microscopia eletrônica de varredura de meristemas florais de *Brachiaria brizantha*. Em preparação.
- Savidan, Y. Chromosomal and embryological analyses in sexual x apomictic hybrids of *Panicum maximum* Jacq. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.58, n.2, p.153-156, 1980.
- Savidan, Y. **Genetics and utilization of apomixis for the improvement of Guinea grass (*Panicum maximum*)**. Proc.XIV Int. Grass Congres. Lexington, KY, USA: Westview Press, Boulder CO, USA, 1983. 182-184 p.
- Savidan, Y. Apomixis, the way of cloning seeds. **Biofutur**, v.2000, p.38-43, 2000a.
- Savidan, Y. Apomixis: Genetics and Breeding. **Plant Breeding Reviews**, v.18, p.13-86, 2000b.

- Savidge, B.; Rounsley, S.D.; Yanofsky, M.F. Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. **Plant Cell**, v.7, n.6, Jun, p.721-33, 1995.
- Schmidt, R.J.; Ambrose, B.A. The blooming of grass flower development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.1, n.1, p.60-67, 1998.
- Schranz, M.E.; Kantama, L.; de Jong, H.; Mitchell-Olds, T. Asexual reproduction in a close relative of *Arabidopsis*: a genetic investigation of apomixis in *Boechera* (Brassicaceae). **New Phytologist**, v.171, n.2, p.425-438, 2006.
- Schwarz-Sommer, Z.; Huijser, P.; Nacken, W.; Saedler, H.; Sommer, H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. **Science**, v.250, n.4983, p. 931(6), 1990.
- Seldulsky, T. *Brachiaria*: Taxonomy of cultivated and native species in Brazil. **Hoehnea**, v.7, p.99-139, 1978.
- Sherwood, R.T.; Berg, C.C.; Young, B.A. Inheritance of apospory in bufflegass. **Crop Science**, v.34, p.1490-1494, 1994.
- Shimamoto, K.; Kyozuka, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. **Annu Rev Plant Biol.**, v.53, p.399-419, 2002.
- Silveira, E.D. **Análise de Expressão Gênica em Ovários de *Brachiaria brizantha* apomítica e sexual e otimização da transformação por biobalística**. Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004. 101 p.
- Silveira, E.D.; Guimarães, L.A.; Alves-Ferreira, M.; Carneiro, V.T.C. **Identificação de genes referência em *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf para estudo de expressão gênica usando qRT-PCR**. Simpósio Internacional sobre Melhoramento de Forrageiras. Campo Grande, MS, 2007. p.
- Silveira, E.D.; Guimarães, L.A.; Martins, N.F.; da Silva, F.R.; Carneiro, V.T.C. **Analysis of EST S from libraries of apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* ovaries in different developmental stages**. XIX International Congress on Sexual Plant Reproduction From gametes to genes. Budapeste, 2006. 212-213 p.
- Sokolov, V.A.; Kindiger, B; Khatypova, I. V. Apomictically Reproducing 39-Chromosome Maize *Tripsacum* Hybrids. **Genetika**, v.34, p.499-506, 1996
- Soon-Kee, S.; Gyung-Hee, Y.; Gynheung, A. Characterization of MdMADS2, a Member of the SQUAMOSA Subfamily of Genes, in Apple. **Plant Physiol.**, v.120, n.4, p. 969-978, 1999.
- Southerton, S.G.; Marshall, H.; Mouradov, A.; Teasdale, R.D. Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. **Plant Physiol.**, v.118, n.2, Oct, p.365-72, 1998.

- Spielman, M.; Vinkenoog, R.; Scott, J.R. Genetic mechanisms of apomixis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.358, n.1434, p.1095-1103, 2003.
- Spillane, C.; Curtis, M.D.; Grossniklaus, U. Apomixis technology development-virgin births in farmers' fields? **Nature Biotechnology**, v.22, n.6, p.687-691, 2004.
- Stur, W.W. Reproductive Development of the Apex of *Brachiaria decumbens* Stapf. **Ann Bot.**, v.58, n.4, 1986, p.569-575, 1986.
- Theissen, G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Curr Opin Plant Biol**, v.4, n.1, Feb, p.75-85, 2001.
- Theissen, G.; Saedler, H. MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. **Curr Opin Genet Dev**, v.5, n.5, Oct, p.628-39, 1995.
- Tucker, M.R.; Araujo, A.C.G.; Paech, N.A.; Hecht, V.; Schmidt, E.D.L.; Rossell, 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, n.7, July 1, 2003, p.1524-1537, 2003.
- Valle, C.B. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. **Documentos**, v.46, p.33, 1990.
- Valle, C.B. 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. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias, p.301-342
- Valle, C.B.; 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 and D. M. A. Dusi (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília- DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. p.47-65
- Valle, C.B.; 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.; Savidan, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: J. W. Miles, B. L. Maass and C. B. d. Valle (Ed.). ***Brachiaria: Biology, agronomy and improvement***. Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA, p.288, 1996.
- Van Dijk, P.J.; Van Baarlen, P.; de Jong, J.H. The occurrence of phenotypically complementary apomixis-recombinants in crosses between sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*). **Sexual Plant Reproduction**, v.16, n.2, p.71-76, 2003.
- Vandenbussche, M.; Zethof, J.; Royaert, S.; Weterings, K.; Gerats, T. The duplicated B-class heterodimer model: whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. **Plant Cell**, v.16, n.3, Mar, p.741-54, 2004.

Watson, L.; Dallwitz, M.J. **Grass genera of the world**. Wallingford, UK: CAB International. 1992

Weigel, D.; Meyerowitz, E.M. The ABCs of floral homeotic genes. **Cell**, v.78, n.2, p.203-209, 1994.

Wilson, Z.A.; Yang, C. Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development. **Reproduction**, v.128, n.5, November 1, 2004, p.483-492, 2004.

Yang, W.C.; Sundaresan, V. Genetics of gametophyte biogenesis in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, n.1, p.53-57, 2000.

Zhang, H.; Forde, B.G. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, v.279, n.5349, Jan 16, p.407-9, 1998.