



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

Caracterização de genes *AGAMOUS*,  
*SEPALLATA* e *AGL6* de Brachiaria brizantha,  
visando compreender a reprodução por  
apomixia

Larissa Arrais Guimarães

Brasília, Abril de 2012



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

Caracterização de genes *AGAMOUS*,  
*SEPALLATA* e *AGL6* de *Brachiaria brizantha*,  
visando compreender a reprodução por  
apomixia

Larissa Arrais Guimarães

Tese de Doutorado apresentada  
ao Departamento de Biologia Celular do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília como requisito  
parcial para a obtenção de título de  
doutora em Ciências Biológicas –  
Biologia Molecular

Brasília, Abril de 2012

Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e no Laboratório de desenvolvimento de plantas no departamento de biologia da *Università degli Studi di Milano*, Milão, Itália.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Vera Tavares de Campos Carneiro

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas (Unicamp)– Examinador externo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Miranda Brasileiro (Embrapa, Cenargen) – Examinadora externa

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Diva Maria de Alencar Dusi (Embrapa, Cenargen) – Examinadora externa

Prof. Dr. Elíbio Leopoldo Rech Filho (Embrapa, Cenargen; UnB) – Examinador interno

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vera Tavares de Campos Carneiro - Orientadora

**Membro Suplente:**

Prof. Dr. Giovanni Rodrigues Vianna (Embrapa, Cenargen)

## Dedicatória

Não quero rosas, desde que haja rosas.  
Quero-as só quando não as possa haver.  
Que hei de fazer das coisas  
Que qualquer mão pode colher?  
Não quero a noite senão quando a aurora  
A fez em ouro e azul se diluir.  
O que a minha alma ignora  
É isso que quero possuir.  
Para quê?... Se o soubesse, não faria  
Versos para dizer que ainda o não sei.  
Tenho a alma pobre e fria...  
Ah, com que esmola a aquecerei?...

Fernando Pessoa, 7-1-1935.

Dedico esta tese à ciência.

A geração de novas ideias, teorias e novos princípios inovam os pensamentos e possibilitam aplicações que poderão revolucionar o saber. A descoberta do desconhecido alimenta o conhecimento, impulsiona o avanço da humanidade e aquece a alma.

## **Agradecimentos**

À Dr<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> Ana Cláudia Guerra pelos ensinamentos e pela ajuda.

Ao Dr. Júlio Carlyle Macedo Rodrigues pelas ideias brilhantes e pela grande ajuda durante toda a execução do Doutorado.

À Ana Cristina Gomes pelo coração de mãe, que acolhe a todos e pelos ensinamentos, e pela grande ajuda na microscopia.

À Dr<sup>a</sup> Adriana Rodriguez pelas lindas fotos de varredura.

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<sup>a</sup> Leila Barros e ao Dr. Mauro Carneiro por ceder os equipamentos do laboratório.

Ringrazio Lucia Colombo e Simona Masiero per avermi fatto fare una bellissima esperienza di laboratorio all'estero e per tutto quello che mi hanno insegnato su *Arabidopsis* ed Yeast two Hybrid.

Sono grata anche ai miei amici:, Francesca, Irma, Dario, Inês, Stefano perchè mi hanno fatto sentire a casa ed amata. Quest'anno in Italia è stato stupendo con voi. Non mi dimenticarò mai della vostra amicizia. Voi sarete sempre nel mio cuore.

À Martinha, minha amiga portuguesa, que foi adotada pelo meu coração como irmã caçula. Muito obrigada, Martinha, por ter sido paciente comigo e por ter feito da minha estadia na Itália algo inesquecível. Aprendi muita coisa de laboratório e da vida com você.

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

Ao CNPq pelo financiamento das bolsas de doutorado e de doutorado sanduiche.

Às minhas amigas apomíticas, Érica Silveira, Ana Luiza Lacerda e Elizângela Alves, Andrea Koehler pela amizade e pelos ensinamentos. O laboratório sem vocês não teria a menor graça. E não seria tão organizado e cheiroso.

Aos meus amigos queridos que fazem parte da minha família: Betúlia, Luisa, Nadinni, Paula, Nicolau e Maria Laine. Todos vocês contribuíram de alguma maneira para o meu crescimento e amadurecimento.

À Lilian pela ajuda no cultivo de *Arabidopsis* na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela ajuda nos testes de duplo híbrido, pela companhia no laboratório e pela amizade.

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

À plataforma de sequenciamento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Ao Rafinha e à Flavinha pelos muitos e muitos e muitos ovários.

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

À Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Brasileiro, Dr<sup>a</sup> Diva Dusi e ao Dr Francisco Aragão pelas opiniões e dicas na qualificação da tese de doutorado

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

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

Aos meus avós (*in memoriam*), que me ensinaram o valor do trabalho nessa vida.

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

À Banca examinadora por aceitarem o convite e por terem contribuído tanto na estruturação da tese.

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






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




## Lista de Figuras





- Figura 1.** Esquema geral do saco embrionário do tipo *Polygonum* formado por sete células: três antípodas, uma célula central, duas sinérgides e oosfera. Adaptado de Dusi e Willemse (1999).....3
- Figura 2.** Organização da flor em *B. brizantha* apresentando flor hermafrodita (Fh) e flor masculina (Fm). Em A, fotomicrografia do meristema floral em microscopia eletrônica de varredura. Em B, espiguetas.....5
- Figura 3.** Representação esquemática dos mecanismos da reprodução sexual e apomítica e seus respectivos tipos de sacos embrionários, baseado em Nogler (1984), 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). .....7
- Figura 4.** Modelo de interação dos fatores de transcrição MADS-box adaptação de Causier *et al.*, 2010 O domínio MADS reconhece a sequência de DNA. Os domínios I e K formam os dímeros e o domínio C está envolvido na formação do complexo multimérico..... 15
- Figura 5.** Esquema da organização floral e modelo ABCE em monocotiledôneas (A e C) e dicotiledôneas (B e D) adaptado de McSteen *et al.*, 2000; Krizek & Fletcher, 2005. pa: pálea; lo: lodícula; st: estame; ca: carpelo; se: sépala; pe: pétala.....17
- Figura 6.** Pistilos de *B. brizantha* nos estádios de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (III e IV) e os processos morfológicos envolvidos em cada estágio de desenvolvimento do ovário de plantas sexuais e apomíticas. adaptado de Rodrigues *et al.*, 2003. Nas plantas sexuais ocorre meiose na célula-mãe do megásporo, o megásporo sobrevivente após três mitoses e diferenciação celular formará o saco embrionário do tipo *Polygonum*. Nas plantas apomíticas ocorre em paralelo, diferenciação de células apospóricas iniciais (ai) a formação de sacos embrionários do tipo *Panicum*, após duas mitoses. Barra: 1mm.....20
- Figura 7.** Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos deduzidas de BbrizAG1 e BbrizAG2 de *B. brizantha*, AG de *A. thaliana* e os homólogos de AG em milho e arroz. As setas indicam a substituição de aminoácidos. A seta pontilhada aponta a substituição. Os domínios MADS e K estão marcados com as linhas contínua e pontilhada, respectivamente. O domínio I está entre os domínios M e K. O domínio C-terminal situa-se após o domínio K. O alinhamento da sequência gerada foi feito utilizando ClustalW, acessado pelo programa Bioedit versão 7. 0. 9. 0.....37
- Figura 8.** Alinhamento da região C-terminal de MADS-box do clado AG-like. Foram utilizadas sequências protéicas de diversas monocotiledôneas, dicotiledôneas e de *Arabidopsis* (Tabela 7). As posições dos dois domínios conservados são indicados acima do alinhamento das sequências. Resíduos de aminoácidos idênticos e similares estão marcados em preto e cinza, respectivamente. O alinhamento da sequência gerada foi feito utilizando ClustalW, acessado pelo programa Bioedit versão 7. 0. 9. 0.....38
- Figura 9.** Alinhamento da região C-terminal de MADS-box do clado SEP-like. Foram utilizadas sequências protéicas de diversas monocotiledôneas, dicotiledôneas e de *Arabidopsis* (tabela 8). As posições dos dois domínios conservados são indicadas acima do alinhamento das sequências. Resíduos de aminoácidos idênticos similares estão marcados em preto e cinza, respectivamente. O alinhamento da sequência gerada foi feito utilizando ClustalW, acessado pelo programa Bioedit versão 7. 0. 9. 0.....39



**Figura 10.** Alinhamento da região C-terminal de MADS-box do clado AGL6-like. Foram utilizadas seqüências proteicas de diversas monocotiledôneas e de *Arabidopsis* (Tabela 9). Seqüência SEP-like de *Arabidopsis* (At SEP1/AGL2) foi inserida no alinhamento para identificação e comparação dos domínios indicados. As posições dos dois domínios conservados são indicadas acima das seqüências alinhadas. Resíduos de aminoácidos idênticos similares estão marcados em preto e cinza, respectivamente. O alinhamento da seqüência gerada foi feito utilizando ClustalW, acessado pelo programa Bioedit versão 7. 0. 9. 0.....40

**Figura 11.** Árvore filogenética do clado AG construída pelo método Neighbour-joining de proteínas MADS-box. A descrição de cada seqüência está na Tabela 7. Os valores de bootstrap (%) de 1.000 replicatas é apresentado em cada ramo. Apenas os valores maiores que 45% são apresentados. Escala representa número de substituições de aminoácidos por sítio      representam dicotiledônea, monocotiledônea, magnoliidae e gimnosperma, respectivamente.....41

**Figura 12.** Árvore filogenética do clado SEP-like construída pelo método Neighbour-joining de proteínas MADS-box. A descrição de cada seqüência está na Tabela 8. Os valores de bootstrap (%) de 1.000 replicatas é apresentado em cada ramo. Apenas os valores maiores que 45% são apresentados. Escala representa número de substituições de aminoácidos por sítio    representam dicotiledônea, monocotiledônea, magnoliidae, respectivamente. ....43

**Figura 13.** Árvore filogenética do clado AGL6-like construída pelo método Neighbour-joining de proteínas MADS-box. A descrição de cada seqüência está na Tabela 9. Os valores de bootstrap (%) de 1.000 replicatas é apresentado em cada ramo. Apenas os valores maiores que 45% são apresentados. Escala representa número de substituições de aminoácidos por sítio     representam dicotiledônea, monocotiledônea, magnoliidae e gimnosperma, respectivamente.....45

**Figura 14.** PCR em tempo real (RT-qPCR) monitorando a expressão de *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6*. A expressão foi analisada em ovário (OV), antera (ANT) nos estádio iniciais de desenvolvimento (I e II) e no estádio maduro (III e IV) anterior à antese, folha e raiz de plantas apomítica (área em preto) e sexual (área hachurada). Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas.....48

**Figura 15.** Detecção dos transcritos *BbrizSEP2* por hibridização in situ em cortes semi-finos. Foram utilizadas para análise anteras (A, K) e ovários (A, B, C, G, H, I) de *B. brizantha* apomítica (A, B, C) e sexual (G, H, I). Hibridização da sonda senso em ovário (D, E, F) e antera (D) de *B. brizantha* apomítica e de ovário (L, M, N) e antera (L) de *B. brizantha* sexual. AP = antípodas; NP = núcleo polar; O = oosfera; PMC = célula-mãe do micrósporo; SY = sinérgide; TP = células do tapete. Barra = 20 µm.....49

**Figura 16.** Detecção dos transcritos de *BbrizAGL6* por hibridização in situ em cortes semi-finos. Foram utilizados anteras (A, D) e ovários (B, E, G, H) de *B. brizantha* apomítica (A, B, G) e sexual (D, E, H). Representação esquemática do resultado de hibridização in situ em megasporogênese de plantas apomítica (C) e sexual (F). Hibridização da sonda senso em ovário (I) e antera (J) de *B. brizantha* apomítica. EA, aparato da oosfera; MMC, célula-mãe do megásporo; N, nucelo; PMC, célula-mãe do micrósporo; TP, tapete. Barra = 20 µm.....51

**Figura 17.** Sílicas e ovários de *A. thaliana* selvagem e contendo os transgenes pSTK::*BbrizAGL6* e pSTK::*AGL6*. Em A sílica cheia de *A. thaliana* selvagem. Em B e C sílicas de plantas transformadas com os transgenes pSTK::*BbrizAGL6* e pSTK::*AGL6*, respectivamente. Pontas das setas indicam aborto de óvulos. Em D, óvulo de *A. thaliana* selvagem clareado no estádio FG5 com os oito núcleos aparentes (três antípodas coloridas em

rosa, dois núcleos polares em azul, duas sinérgides em verde e uma oosfera em amarelo). Em E e F, óvulos clareados das plantas transformadas com os transgenes *pSTK::BbrizAGL6* e *pSTK::AGL6*, respectivamente, no estágio correspondente a FG5 com apenas um núcleo, indicado pelas setas. En: endotélio. Em A, B e C, barra = 1.25 mm. Em D, E e F, barra = 20µm.....58

**Figura 18.** PCR em tempo real (RT-qPCR) monitorando a expressão de *BbrizAGL6* e de *AGL6* em plantas transgênicas. Barras em preto e em cinza indicam expressão relativa de *BbrizAGL6* e de *AGL6*, respectivamente, em plantas transgênicas contendo os transgenes *pSTK::BbrizAGL6*.(A) e *pSTK::AGL6*. (B). Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas.....59

**Figura 19.** Padrão de expressão do promotor *pWM* em *A. thaliana*. Óvulos de *A. thaliana* em megasporogênese (A) e após fertilização (B) mostrando expressão de *GUS* dirigida sob o controle do promotor *pWM* em todo o óvulo somente durante megagametogênese. Barra = 20µm.....60

**Figura 20.** Sementes de *A. thaliana* em desenvolvimento, após clareamento com . Sementes de plantas contendo os transgenes *pWM::BbrizAGL6* (A e D), *pWM::AGL6* (B e E) mostrando desenvolvimento do embrião (A e B) somente até a fase torpedo e formação das camadas da semente com células alongadas (D e E) em comparação à planta selvagem (F). C representa a formação do embrião na planta selvagem. Camadas que compõem a semente são representadas em cores. Barra = 20 µm.....62

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Sequências dos iniciadores utilizados na clonagem de <i>BbrizAG</i> e <i>BbrizSEP</i> .....  | 22 |
| <b>Tabela 2.</b> Sequências dos iniciadores utilizados nos experimentos de 5'RACE .....   | 24 |
| <b>Tabela 3.</b> Sequências dos iniciadores utilizados em RT-qPCR para amplificar genes de <i>Brachiaria (Bbriz)</i> e de <i>Arabidopsis</i> .....  | 29 |
| <b>Tabela 4.</b> Sequências dos iniciadores utilizados na clonagem de <i>AGL6</i> , <i>BbrizAG</i> , <i>BbrizSEP2</i> e <i>BbrizAGL6</i> .....  | 32 |
| <b>Tabela 5.</b> Sequências dos iniciadores utilizados na detecção dos transgenes <i>pSTK::BbrizAGL6</i> , <i>pSTK::AGL6</i> , <i>pWM::BbrizAGL6</i> , <i>pWM::AGL6</i> .....   | 34 |
| <b>Tabela 6.</b> Comparação das sequências dos genes MADS-box identificadas em <i>B. brizantha</i> com os melhores resultados de sequências de monocotiledôneas obtidos em BLASTX .....   | 36 |
| <b>Tabela 7.</b> Número de acesso de proteínas selecionadas para a construção da árvore filogenética referente aos genes do caldo AG.....   | 42 |
| <b>Tabela 8.</b> Número de acesso de proteínas selecionadas para a construção da árvore filogenética referente aos genes do clado SEP.....  | 44 |
| <b>Tabela 9.</b> Número de acesso de proteínas selecionadas para a construção da árvore filogenética referente aos genes do clado AGL6.....   | 46 |
| <b>Tabela 10.</b> Ensaios de duplo híbrido de MADS-box de <i>A. thaliana</i> e de <i>B. brizantha</i> .....   | 53 |
| <b>Tabela 11.</b> Número de óvulos abortados em plantas contendo os transgenes <i>pSTK::BbrizAGL6</i> ou <i>pSTK::AGL6</i> . Como controle, foram utilizadas plantas que apresentavam a presença dos transgenes, mas não apresentavam fenótipo..... | 57 |
| <b>Tabela 12.</b> Número de sementes abortadas em plantas contendo os transgenes <i>pWM::BbrizAGL6</i> ou <i>pWM::AGL6</i> . Como controle foram utilizadas plantas que apresentavam a presença dos transgenes, mas não apresentavam fenótipo.....  | 61 |

## Abreviaturas

|       |  |
|-------|--|
| BCIP  | 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt |
| BLAST | <i>basic local alignment search tool</i>             |
| bp    | pares de base  |
| cDNA  | ácido desoxirribonucléico complementar               |
| DEPC  | dietilpirocarbonato                                  |
| DNA   | ácido desoxirribonucléico                            |
| DNase | desoxirribonuclease                                  |
| dNTP  | desoxirribonucleotídeos trifosfato                   |
| EDTA  | ácido etilenodiamino tetra-acético                   |
| g     | grama  |
| GUS   | $\beta$ -glucuronidase                               |
| h     | hora   |
| IPTG  | isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo           |
| k     | quilo  |
| L     | litro  |
| LB    | Luria Bertani  |
| m     | mili   |
| M     | molar  |
| NBT   | Nitro-Blue Tetrazolium Chloride                      |
| p     | peso   |
| PCR   | reação em cadeia de polimerase                       |
| pH    | potencial hidrogenionte                              |
| RNA   | ácido ribonucléico                                   |
| RNAse | ribonuclease   |
| rpm   | rotações por minuto                                  |
| RT    | transcriptase reversa                                |
| SDS   | dodecil sulfato de sódio                             |
| TRIS  | tri (hidroximetil) aminometano                       |
| v     | volume   |
| X-Gal | 5-bromo- 4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo  |
| °C    | graus Celsius  |
| $\mu$ | micro  |

## Sumário

|  |      |
|--|------|
| Dedicatória .....  | I    |
| Agradecimentos .....   | II   |
| Lista de Figuras.....  | V    |
| Lista de Tabelas .....   | VIII |
| Abreviaturas .....   | IX   |
| Resumo .....   | XII  |
| Abstract .....   | XIII |
| 1. Introdução.....   | 1    |
| 1.1. O ciclo de vida de plantas e animais .....                                    | 1    |
| 1.2. Reprodução sexual em plantas superiores .....                                 | 2    |
| 1.3. <i>Brachiaria brizantha</i> .....   | 4    |
| 1.3.1. Aspectos gerais .....   | 4    |
| 1.4. Apomixia .....  | 6    |
| 1.4.1. Definição.....  | 6    |
| 1.4.2. Ploidia e Apomixia .....  | 8    |
| 1.4.3. Interesse da apomixia na agricultura .....                                  | 8    |
| 1.4.4. Contribuição do estudo da reprodução sexual na elucidação da apomixia ..... | 9    |
| 1.4.5. Estudo da reprodução assexuada em apomíticos naturais .....                 | 11   |
| 1.5. Genes do tipo MADS-Box .....  | 13   |
| 1.5.1. MADS-Box em plantas .....   | 15   |
| 1.5.2. Papel de MADS-Box na identidade e desenvolvimento do óvulo e apomixia ..... | 18   |
| 2. Objetivo geral.....   | 19   |
| 2.1. Objetivo específico.....  | 19   |
| 3. Material e Métodos .....  | 20   |
| 3.1. Material Vegetal .....  | 20   |
| 3.2. Extração de RNA total de ovários e anteras de <i>B. brizantha</i> .....       | 21   |
| 3.3. Extração de RNA total de folhas e raízes de <i>B. brizantha</i> .....         | 21   |
| 3.4. Clonagem de MADS-Box utilizando iniciadores degenerados .....                 | 22   |
| 3.5. Reação de 5' RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends .....                    | 23   |
| 3.1. Minipreparação de DNA plasmidial .....  | 24   |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.2.   | Análises filogenéticas.....  | 25 |
| 3.3.   | Hibridização in situ .....   | 25 |
| 3.3.1. | Preparo do material .....  | 25 |
| 3.3.2. | Inclusão em BMM .....  | 26 |
| 3.3.3. | Síntese das sondas marcadas com digoxigenina .....   | 26 |
| 3.3.4. | Reação de hibridização .....   | 27 |
| 3.3.5. | Reação de pós-hibridização e detecção imunológica .....  | 27 |
| 3.4.   | Reação de PCR em tempo real, RT-qPCR.....  | 28 |
| 3.5.   | Transformação em pequena escala de levedura .....  | 29 |
| 3.6.   | Ensaio de duplo híbrido.....   | 30 |
| 3.7.   | Clonagem do promotor <i>WM</i> .....   | 32 |
| 3.8.   | Construção dos vetores binários.....   | 32 |
| 3.9.   | Transformação de <i>A. thaliana</i> por imersão de botões florais. ....  | 33 |
| 3.9.1. | Preparo das plantas .....  | 33 |
| 3.9.2. | Imersão de botões florais de <i>Arabidopsis</i> . ....   | 33 |
| 3.9.3. | Análise dos transformantes de <i>Arabidopsis</i> .....   | 33 |
| 3.10.  | Clareamento de óvulos de <i>A. thaliana</i> .....  | 34 |
| 4.     | Resultados.....  | 35 |
| 4.1.   | Análises das sequências de genes MADS-box de <i>B. brizantha</i> em bancos de dados.....   | 35 |
| 4.2.   | Análises filogenéticas de genes MADS-box de <i>B. brizantha</i> .....  | 40 |
| 4.3.   | Perfil de expressão de genes do tipo MADS-box em <i>B. brizantha</i> .....   | 47 |
| 4.4.   | Localização temporal e espacial de <i>BbrizSEP2</i> e <i>BbrizAGL6</i> em tecidos reprodutivos de <i>B. brizantha</i> .....                  | 48 |
| 4.5.   | Análise de interação proteína-proteína com os componentes dos complexos multiméricos responsáveis pela identidade do carpelo e do óvulo..... | 51 |
| 4.6.   | Expressão de <i>BbrizAGL6</i> e <i>AGL6</i> em <i>Arabidopsis</i> sob controle dos promotores STK e WM.....                                  | 53 |
| 5.     | Discussão .....  | 63 |
| 6.     | Conclusões.....  | 74 |
| 7.     | Perspectivas .....   | 75 |
|        | Referências Bibliográficas.....  | 76 |

## Resumo

*Brachiaria brizantha* constitui um sistema adequado para comparar a reprodução sexual e assexual por semente, apomixia, pois apresenta acessos sexuais, que contem sacos embrionários reduzidos, e apomíticos, com sacos embrionários não-reduzidos. Em plantas apomíticas, o embrião formado no saco embrionário não-reduzido se desenvolve independente da fertilização, dando origem a uma progênie idêntica à planta-mãe. A caracterização de genes do tipo MADS-box, fatores de transcrição que regulam a determinação e especificação dos órgãos florais, na formação do carpelo, do óvulo e do saco embrionário em *B. brizantha* pode contribuir na elucidação das vias moleculares envolvidas em sua reprodução. Neste trabalho, três tipos de genes MADS-box foram clonados: *BbrizAG*, *BbrizSEP* e *BbrizAGL6* e sua expressão foi analisada ao longo do desenvolvimento dos gametófitos, visando compreender a reprodução por apomixia. Dois genes do tipo AG foram encontrados em *B. brizantha*, *BbrizAG1* e *BbrizAG2*, o primeiro mais expresso em anteras da planta apomítica e o segundo em anteras da planta sexual. *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6* foram preferencialmente expressos em ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais. *BbrizAGL6* apresentou modulação da expressão em plantas apomíticas e sexuais e demonstrou maior expressão em ovários. Transcritos de *BbrizAGL6* foram localizados preferencialmente no nucelo e na célula-mãe do megásporo (MMC) de ovários da planta apomítica e somente na MMC de ovários da planta sexual. MADS-box de *B. brizantha* formaram dímeros com proteínas que regulam a identidade do carpelo e do óvulo de *Arabidopsis* e com as proteínas similares de *B. brizantha*. A expressão ectópica de *BbrizAGL6* e de *AGL6* em tecidos esporofíticos e gametofíticos de óvulos de plantas transgênicas de *Arabidopsis* durante os estádios iniciais de desenvolvimento e após a fertilização gerou aborto de óvulos e de sementes, respectivamente. Os resultados sugerem que MADS-box em *B. brizantha* desempenham papel conservado na formação de complexos multiméricos envolvidos na formação do órgão reprodutor feminino. Entretanto, a expressão de alguns genes MADS-box de *B. brizantha*, diferencial em plantas apomítica e sexual, indica possível envolvimento desses genes nas vias que determinam o tipo de reprodução. *BbrizAGL6* e *AGL6* parecem desempenhar papel importante na formação do saco embrionário de plantas com reprodução apomítica e sexual.

## Abstract

*Brachiaria brizantha* is a suitable system for studying plant reproduction due to the occurrence of apomictic and sexual accessions within the same species. The embryo formed in unreduced embryo sac of apomicts develops independently of fertilization. Characterization of MADS-box genes can provide tools for the elucidation of the reproductive pathways of this species. Three MADS-Box genes related with reproductive organs formation in apomictic and sexual plants were cloned: *BbrizAGL6*, *BbrziSEP2* and *BbrizAG*. Two *BbrizAG* were found, one being more expressed in anthers of apomictic plants while the other was more expressed in anthers of sexual plants. *BbrizSEP2* and *BbrizAGL6* were preferentially expressed in ovaries and anthers of apomictic and sexual plants. *BbrizAGL6* showed expression modulation especially in ovaries from apomictic and sexual plants. *BbrizAGL6* transcripts were localized in the nucellus, where aposporic initials cells differentiate, and in the megaspore mother cell (MMC) of apomictic plants and, only, in the MMC of the sexual plants during early stages of ovule development. The *B. brizantha* MADS box genes formed dimers related to ovule and carpel identity and also interacted with *Arabidopsis* transcription factors. In *Arabidopsis* ovaries, *AGL6* is present only in sporophytic tissues. *Arabidopsis* plants expressing *BbrizAGL6* or *AGL6* in sporophytic and gametophytic tissues during early embryo sac development and after fertilization had the normal ovule and seed development altered. Our results suggest that MADS-box genes in *B. brizantha* play a conserved role in the multimeric complex formation. MADS-box expression profile from *B. brizantha* was slightly different in apomictic and sexual plants suggesting a role of these genes in the determination of the type of reproduction. *BbrizAGL6* and *AGL6* seem to be involved in the embryo sac formation of apomictic and sexual plants.



## **1. Introdução**

### **1.1. O ciclo de vida de plantas e animais**

A reprodução sexual de plantas e animais ocorre por meio da fusão de gametas. Entretanto, a formação desses gametas é drasticamente diversa entre os reinos animal e vegetal. O desenvolvimento contínuo, a ausência de linhagem germinativa, a flexibilidade e reversibilidade da diferenciação celular, a existência de gerações haplóides e diplóides e a dupla fertilização são características únicas da reprodução sexual de plantas superiores (Raven et al., 2005; Walbot & Evans, 2003; Dickinson & Grant-Downton, 2009).

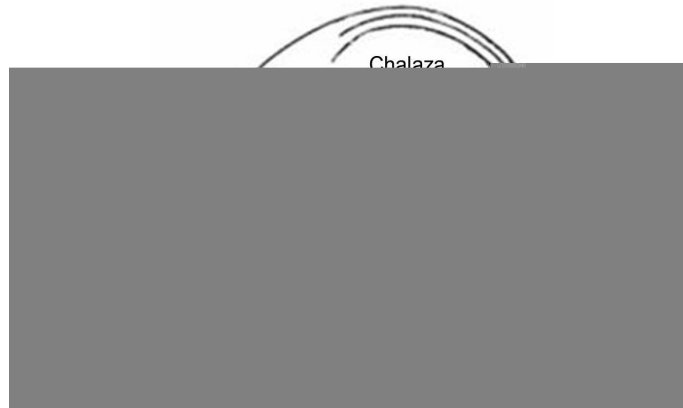
Em plantas, o desenvolvimento vegetativo é caracterizado pela formação exclusiva de células somáticas, como as células que formam as folhas, por exemplo. As células do meristema apical que determinam a formação de células somáticas podem ter seu programa genético alterado e formar as estruturas reprodutivas que compõem o órgão floral. No órgão floral, algumas células sofrem meiose e dão origem aos gametófitos. A produção de gametas, portanto, ocorre a partir de células somáticas que são direcionadas ao programa reprodutivo (Walbot & Evans, 2003). Em contrapartida, em animais, a linhagem germinativa é definida ainda durante o desenvolvimento do embrião e permanece com seu destino definido durante todo o ciclo de vida animal. As células da linhagem germinativa são as únicas que sofrerão meiose para gerar os gametas masculino e feminino (Walbot & Evans, 2003; Dickinson & Grant-Downton, 2009).

Em plantas, observa-se a alternância de gerações. Em angiospermas, células diplóides especializadas, que pertencem ao esporófito, sofrem meiose e geram esporos haplóides. Os esporos, em seguida, sofrem proliferação celular e diferenciação para o desenvolvimento de gametófitos haplóides multicelulares (Drews et al., 2011). O gametófito feminino multicelular de

plantas apresenta dois gametas que serão fertilizados pelas células espermáticas do gametófito masculino, dando origem ao endosperma e ao embrião. O endosperma protege o embrião e controla a transferência de nutrientes da mãe e, em algumas espécies, estoca reservas na semente. O papel do endosperma pode ser comparado ao da placenta em mamíferos (Berger et al., 2008). Já no reino animal, os gametas são unicelulares e haplóides, sendo resultados diretos do processo meiótico (Walbot & Evans, 2003). Apesar das diferenças encontradas nos processos de geração de gametas no reino animal e de gametófitos no reino vegetal, o ciclo meiótico é ainda conservado (Liu & Qu, 2008).

## **1.2. Reprodução sexual em plantas superiores**

O óvulo representa o órgão floral reprodutivo feminino de plantas. Em ovários de angiospermas, a geração esporofítica, oriunda de tecido maternal e diplóide, protege e participa da formação da geração haplóide, que dará origem ao gametófito feminino (megagametófito ou saco embrionário - SE). Na reprodução sexual, durante o desenvolvimento do SE, após a redução cromossômica por meiose da célula-mãe do megásporo (MMC), três megásporos degeneram e um megásporo funcional é formado. Após três mitoses e diferenciação, SE com sete células do tipo *Polygonum* é gerado, contendo: uma oosfera, uma célula central, duas sinérgides e três antípodas (Fig.1). Durante a dupla fertilização, a oosfera e a célula central são fertilizadas por dois núcleos espermáticos provenientes do grão de pólen, originando o embrião e o endosperma, respectivamente (Berger et al., 2008).



**Figura 1.** Esquema geral do saco embrionário do tipo *Polygonum* formado por sete células: três antípodas, uma célula central, duas sinérgides e oosfera. Adaptado de Dusi e Willemse (1999).

As células do SE controlam diversos mecanismos envolvidos na fertilização como o direcionamento do tubo polínico, liberação das células espermáticas, desenvolvimento do embrião e do endosperma (Drews et al., 2011). A determinação da identidade de cada célula é concomitante à celularização do SE. Os mecanismos que controlam a diferenciação das células que compõem o SE ainda não foram completamente elucidados. Trabalhos recentes apontam a auxina como um sinal crucial para o desenvolvimento das estruturas assimétricas do gametófito feminino em *Arabidopsis* (Pagnussat et al., 2009). A distribuição de auxina durante a formação do SE é polarizada e mantida até o estágio de celularização, com maior concentração na região onde se localizam as sinérgides e oosfera (região micropilar) e menor onde se posicionam as antípodas (região chalazal). À medida que o SE amadurece, a distribuição de auxina torna-se menos polarizada (Pagnussat et al., 2009; Sundaresan & Alandete-Saez, 2010). A perturbação desse gradiente afeta a diferenciação celular no SE (Pagnussat et al., 2009).

No ovário, além dos processos relevantes da reprodução sexual, se observam processos da reprodução assexuada por semente, conhecida como apomixia (Koltunow & Grossniklaus, 2003). A reprodução sexual e apomixia se diferenciam em dois principais aspectos: meiose durante a megasporogênese e a fertilização (Koltunow & Grossniklaus, 2003).

### 1.3. *Brachiaria brizantha*

#### 1.3.1. Aspectos gerais

A subfamília Panicoideae inclui aproximadamente 208 gêneros reunidos em diversas tribos, entre elas, Paniceae com mais de 110 gêneros incluindo milho, sorgo e cana de açúcar (Watson & Dallwitz, 1992; Ciaffi et al., 2011).

Divisão: Anthophyta

Subdivisão: Angiospermae

Classe: Monocotyledonae

Ordem: Poales (Glumiflorales)

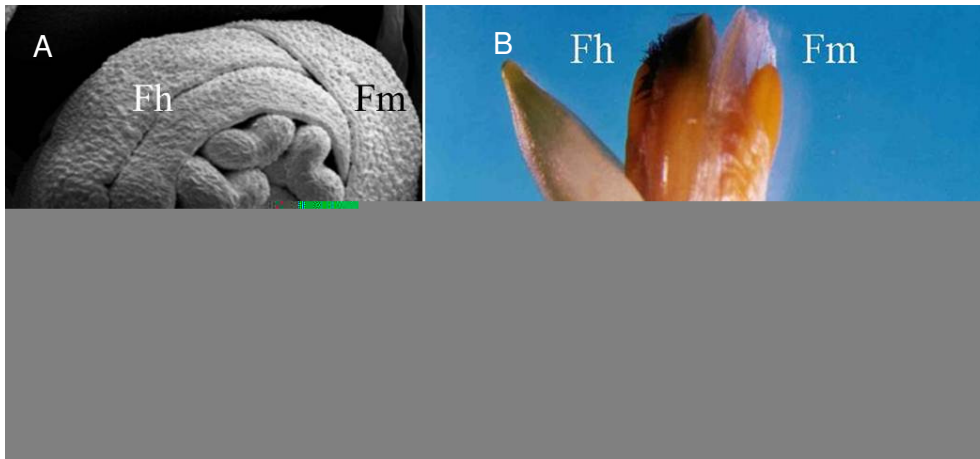
Família: Poaceae (Gramineae)

Subfamília: Panicoideae

Tribo: Panicea

Gênero: *Brachiaria*

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) e é representado por aproximadamente 100 espécies (Renvoize et al., 1996). 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 *B. 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 (Fig.2). 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).



**Figura 2.** Organização da flor em *B. brizantha* apresentando flor hermafrodita (Fh) e flor masculina (Fm). Em A, fotomicrografia do meristema floral em microscopia eletrônica de varredura. Em B, espigueta.

Algumas espécies do gênero *Brachiaria*, em geral as de antécio rugoso como *B. brizantha* passaram a ser consideradas como pertencentes ao gênero *Urochloa* (Shirasuna, 2010.), embora alguns autores sugiram que seja realizada recircunscrição do gênero *Urochloa* (Salariato et al., 2008.) para adoção da nova nomenclatura. A orientação dos taxonomistas e da curadoria de gramíneas forrageiras da Embrapa, por estas razões e, pelo fato de a legislação brasileira de sementes ser baseada no nome *Brachiaria* é de que seja mantida a nomenclatura *B. brizantha* para esta espécie indicando-se a sinonímia com *Urochloa brizantha* na primeira citação.

No Brasil, utiliza-se amplamente como pastagem *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*) cv. Marandu. Em 1996, Fisher e Kerridge estimaram aproximadamente 70 milhões de hectares cultivados com braquiária. A criação do rebanho bovino ocorre principalmente com a utilização de pastagens e o maior rebanho bovino comercial do mundo situa-se no Brasil, com 205 milhões de cabeças (Karia et al., 2006) e movimenta em torno de R\$ 12 bilhões por ano (Polaquini et al., 2006). As cultivares mais usadas no país se reproduzem por apomixia e atualmente predominam na enorme área de pastagens do país, *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu (Valle et al 2004).

Em *B. brizantha* observa-se, na mesma espécie, plantas com modo de reprodução sexual e apomítico. A apomixia encontrada em *Brachiaria* é do tipo apospórica, caracterizada pela formação de iniciais apospóricas que posteriormente se desenvolvem e formam SE não reduzido que se diferencia

morfologicamente do SE reduzido, característico da sexual (Dusi & Willemse, 1999; Araújo et al., 2000b). Essas características associadas à importância dessa planta na produção agrônômica do Brasil apontam *Brachiaria* como um excelente modelo para o estudo dos diferentes modos de reprodução.

## **1.4. Apomixia**

### **1.4.1. Definição**

A apomixia é caracterizada pela omissão da meiose e da fertilização da oosfera dando origem a uma progênie idêntica à planta mãe com o desenvolvimento autônomo do embrião a partir da oosfera não reduzida. A apomixia foi observada em mais de 400 espécies de plantas de 40 famílias - entre elas Poaceae, Asteraceae, Rosaceae e Rutaceae (Hanna & Bashaw, 1987; Carman, 1997).

De acordo com Nogler (1984), apomixia pode ser dividida em : aposporia, diplosporia e embrionia adventícia, baseado na origem e no desenvolvimento do embrião. Na embrionia adventícia (apomixia esporofítica), o embrião se desenvolve diretamente de uma célula somática (Fig. 3). Já aposporia e diplosporia, tipos de apomixia gametofítica (Nogler, 1984), são classificadas dependendo da origem da célula que inicia a formação do SE não-reduzido (Nogler, 1984). Quando a diferenciação da célula precursora se dá a partir da MMC que apresenta falhas nos processos meióticos é chamada diplosporia (Nogler, 1984) (Fig. 3). A aposporia é caracterizada pela diferenciação de múltiplos precursores a partir de células esporofíticas chamadas iniciais apospóricas (AI), em uma posição diferente daquela ocupada pela MMC (Asker & Jerling, 1992; Dusí & Willemse, 1999; Araújo et al., 2000b). Na apomixia facultativa, a MMC pode concomitantemente formar um SE reduzido (Fig. 3). A embriogênese ocorre de forma autônoma sem a fertilização da oosfera em SE do tipo apospórico. A formação do endosperma pode ocorrer de forma autônoma no caso de *Hieracium*, por exemplo, ou pode exigir fertilização, no caso de *Brachiaria*, sendo chamada de pseudogamia (Nogler, 1984; Koltunow et al., 1998; Alves et al., 2001).



**Figura 3.** Representação esquemática dos mecanismos da reprodução sexual e apomítica e seus respectivos tipos de sacos embrionários, baseado em Nogler (1984), 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).

### 1.4.2. Ploidia e Apomixia

Apomixia gametofítica, por alguma razão, muitas vezes está relacionada com poliploidia (Asker & Jerling, 1992). A relação entre apomixia e poliploidia foi investigada por duplicação de cromossomos e cruzamentos interespecíficos. O efeito da duplicação de cromossomos foi estudado em plantas diplóides que apresentavam reprodução sexual. Em *Paspalum*, o sucesso na manifestação da apomixia após a duplicação artificial de cromossomos foi maior nas plantas que pertenciam a grupos que apresentavam previamente a apomixia (Quarin & Hanna, 1980; Quarin et al., 1998; Quarin et al., 2001).

No gênero *Brachiaria*, o número básico de cromossomos é  $X=9$ . Geralmente as plantas apomíticas são tetraplóides ( $2n=4X=36$ ), no caso de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. mutica* ou hexaplóides, no caso de *B. humidicola*. Os diplóides naturais ( $2n=2X=18$ ) encontrados em *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* são sexuais (Dusi et al., 2004).

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* onde genitor apomítico teria o genótipo Aaaa e o sexual aa, conforme sugerido pelas análises de segregação. As plantas sexuais tetraploidizadas se tornariam, portanto aaaa (Valle et al., 1994; Valle et al., 2004) e, portanto, não expressariam a apomixia.

### 1.4.3. Interesse da apomixia na agricultura

A apomixia apresenta potencial de grande aplicação na agricultura, pois resulta na produção de uma progênie clonal por semente. Essa característica aplicada a plantas que não possuem esse modo de reprodução permitirá a fixação de genótipos de interesse em híbridos, em variedades adaptadas a ecossistemas muito restritos e em genótipos-elite e facilitará a produção em massa gerando redução de custos. Além disso, impedirá a perda de vigor na produção de sementes de híbridos (Calzada et al., 1996; Spielman et al., 2003; Spillane et al., 2004) e facilitará a propagação e estoque por sementes de culturas que são propagadas vegetativamente evitando ainda a transferência



viral (Bicknell & Koltunow, 2004). Foi estimado que a aplicação da apomixia somente em plantações de arroz e trigo aumentaria a produção em 30% e 15%, respectivamente, acarretando anualmente um excedente de 17 bilhões de dólares (Carman, 2004). A quebra da apomixia, por outro lado, é também de grande interesse, pois permitirá a recombinação gênica, aumentando a variabilidade de espécies que se reproduzem preferencialmente por apomixia (Spillane et al., 2004).

#### **1.4.4. Contribuição do estudo da reprodução sexual na elucidação da apomixia**

A análise de mutantes de plantas que produzem semente preferencialmente por reprodução sexual em busca de características apomíticas vem sendo uma abordagem bastante utilizada no entendimento dos diferentes modos de reprodução. Diversos estudos apontam a apomixia gametofítica como resultado da alteração e desregulação do processo sexual (Koltunow & Grossniklaus, 2003). As diferenças entre o modo de reprodução sexual e apomixia gametofítica são pontuais e se caracterizam pela ausência ou interrupção de meiose durante a formação do SE não reduzido associado à formação autônoma do embrião. Em algumas plantas apomíticas a célula central não é fertilizada e o endosperma também é gerado de forma autônoma. Dessa forma, uma maneira de entender os mecanismos moleculares envolvidos na apomixia seria a análise de mutantes que apresentam alterações na fertilização, durante embriogênese e durante diferenciação do SE.

Os genes identificados até o momento em mutantes que apresentaram desenvolvimento autônomo do endosperma e parcial desenvolvimento autônomo do embrião são do tipo *FIE* e *FIS*. Os mutantes de *FIE* (*fertilization independent endosperm*), *FIS1*, *FIS2* e *FIS3* (*fertilization independent seed*), sendo *FIS3* equivalente a *FIE*, foram capazes de ativar o desenvolvimento do endosperma, e até um desenvolvimento parcial do embrião em *A. thaliana* (Ohad et al., 1996; Chaudhury et al., 1997). Esses genes agem na repressão da atividade de genes do desenvolvimento da semente, além de ter um papel positivo no desenvolvimento do embrião após a fertilização. O desenvolvimento autônomo do embrião pode ser elucidado com a identificação de genes marcadores da embriogênese como *SERK* e *BABY BOOM* uma vez que a

embriogênese somática e o desenvolvimento autônomo do embrião envolvem alteração do destino da célula para formação de um embrião. O gene *SERK* (*somatic embryogenesis receptor kinase*), inicialmente isolado de culturas de células de cenoura codifica um receptor transmembrânico do tipo cinase rico em leucina e está relacionado a células capazes de formar embriões somáticos (Schmidt et al., 1997). *BABY BOOM* (*BBM*) codifica um fator de transcrição capaz de induzir a formação espontânea de embriões somáticos em cultura de *B. napus* (Boutilier et al., 2002).

Dentre os genes envolvidos nas diversas etapas da diferenciação do SE foram identificados *SPOROCTELESS/NOZZLE* (*SPL/NZZ*) (Schieffhaller et al., 1999; Yang, W. C. et al., 1999) e *SWI1/DYAD* em *Arabidopsis*, *MSP1* e *MEL1* (Nonomura et al., 2007) em *Oryza sativa* e o mutante *mac1* em *Zea mays*. *SPL* codifica um fator de transcrição e demonstrou estar envolvido na iniciação da megasporogênese e microsporogênese. O mutante do gene *SWI1/DYAD* de *A. thaliana* apresenta um fenótipo relacionado à apomeiose, gerando SE não reduzido assemelhando à apomixia diplospórica onde ocorre alteração da meiose e formação de um SE não reduzido, a partir de uma célula diplóide após a divisão meiótica (Ravi et al., 2008). Entretanto esse SE não-reduzido produzido no mutante não é viável, como ocorre em ovários de plantas apomíticas. Posteriormente foi obtido um triplo mutante para os genes *AtSpo11-1/ AtRec8/ AtOsd1* (*MIME*) com características de apomeiose, assim como os mutantes de *SWI1/DYAD*, que formaram díades (diplóides) e foram capazes de gerar zigotos viáveis após a fertilização (D'erfurth et al., 2009). O cruzamento do mutante *dyad* ou do triplo mutante *MIME* com uma linhagem que elimina cromossomos após a fertilização foi capaz de produzir clones por semente (Marimuthu et al.2011). Essa técnica, portanto, aumentou as expectativas para a aplicação da apomixia em importantes cultivares. Entretanto a obtenção de clones por semente nestes mutantes exige ainda a fertilização do gametófito feminino.

Além desses mutantes com características de apomeiose, também foram identificados genes envolvidos na identidade e na restrição das células que irão se diferenciar em gametas feminino e masculino. O mutante *mac1*, descrito em *Zea mays*, apresentou mudança no destino de células do tecido

esporófito (Sheridan et al., 1996; Sheridan et al., 1999), gerando um número maior de células arqueospóricas em relação à planta selvagem. Em *Oryza sativa* foram identificados *MSP1* (*multiple sporocyte*) e *MEL1* que estão envolvidos nas etapas iniciais da esporogênese. *MSP1* codifica um receptor transmembrânico do tipo cinase e tem papel importante na restrição do número de células que irão entrar no programa de esporogênese (Nonomura et al., 2003) (Nonomura et al., 2007). *MEL1* é um gene da família Argonauta, e está envolvido na identidade da célula germinativa e em modificações da cromatina. Esse gene tem importância na identidade dos gametas no estágio inicial de diferenciação, porém não está diretamente relacionado à formação de apospóricas iniciais sua diferenciação (apomeiose), que ocorrem nas plantas apomíticas. No entanto, recentemente foi descoberto que mutantes em *Arabidopsis* e *Zea mays* de outros genes do tipo argonauta, que também possuem um importante papel na determinação do destino celular, apresentaram características fenotípicas que se assemelham a processos observados na apomixia. No mutante *ago9* em *Arabidopsis* ocorreu a diferenciação de múltiplas células no nucelo que iniciaram a gametogênese, um processo similar a aposporia (Olmedo-Monfil et al. 2010). Em *Zea mays*, o mutante *ago104* foi capaz de produzir SE não reduzidos, assemelhando-se à diplosporia (Singh et al., 2011).

#### **1.4.5. Estudo da reprodução assexuada em apomíticos naturais**

Estudos que visam compreender os mecanismos de apomixia em plantas naturalmente apomíticas utilizam a análise do perfil de expressão gênica durante a formação do SE e embrião dessas plantas. Em geral, são realizados estudos comparativos de genótipos relacionados que possuam os dois tipos de SE reduzido e não reduzido. Algumas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas são utilizadas como modelo, incluindo membros do gênero *Boechera*, *Brachiaria*, *Hieracium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Poa*, *Tripsacum*, e *Ranunculus* (revisado por Ozias-Akins, 2006). Em *Pennisetum ciliare*, a construção e hibridização subtrativa de biblioteca de cDNA seguida de macroarranjo, northern e RT-PCR permitiram a identificação de dois genes *Pca21* e *Pca24*, ainda com função pouco conhecida (Singh et al., 2007). Em plantas apomítica e sexual de *Hieracium*, foram identificadas

diferenças no padrão de expressão do gene *FIS2* durante a formação dos megásporos em SE não reduzido quando comparado ao SE meiótico apontando a sua importância na formação do embrião e do endosperma para ambos os modos de reprodução (Rodrigues et al., 2008). O sequenciamento de BACs da região específica da apomixia (ASGR) em *Paspalum squamulatum* permitiram a identificação de sequências com similaridade a proteínas com diferentes funções, transposons, e também sequências com similaridade a genes associados à embriogênese somática (Conner et al., 2008). A identificação de genes envolvidos na embriogênese somática, como *PpSERK* que é similar ao *SERK* de arroz, também foi encontrada em *Poa pratensis* após o isolamento de mais de 150 sequências potencialmente associadas à apomixia (Albertini et al., 2004). Além de *PpSERK* também foi identificado APOSTART, que pode estar envolvido com o mecanismo de morte celular programada das células em degeneração durante a megasporogênese (Albertini et al., 2005).

Em *B. brizantha*, foram feitas análises comparativas da expressão de genes em ovários na megasporogênese e na megagametogênese, de plantas apomíticas e sexuais (Rodrigues et al., 2003). Após análise de expressão diferencial, foram eleitos de acordo com o padrão de expressão 11 clones e, por comparação em bancos de dados, cinco desses clones apresentaram homologia com proteínas conhecidas. Dentre elas, uma miosina, uma proteína cinase do tipo MAPK e uma aquaporina (Rodrigues et al., 2003). A localização espacial dos transcritos desses genes foi feita por hibridização in situ (Alves et al., 2007). Além dessas análises, recentemente construímos bibliotecas de cDNA de ovários de *B. brizantha* na megasporogênese e na megagametogênese, de plantas apomíticas e sexuais seguido de macroarranjo e RT-qPCR (Silveira et al 2012). Foram identificadas similaridades de alguns ESTs a genes do desenvolvimento reprodutivo em outras plantas e também envolvidos à resposta ao estresse. Dentre esses genes também foram encontrados dois genes do tipo MADS-Box que foram em seguida estudados com maior detalhe durante essa tese de doutorado. Visando restringir as análises às células iniciais apospóricas, mRNA isolado dessa região e também de células nucleares por microdissecção à laser (LCM), juntamente com mRNA

isolado de ovários em megasporogênese e megagametogênese de *B. brizantha* apomítica e sexual, foram enviados para sequenciamento em larga escala, que permitirá detectar e comparar o conjunto de genes expressos nessas células (dados não publicados). O estudo molecular do modo de reprodução das plantas naturalmente apomíticas e a comparação com plantas sexuais pode permitir a detecção de diferenças na expressão gênica que definem os pontos de regulação envolvidos na formação de SE diferenciados e característicos da apomixia. É possível que o desenvolvimento do SE, tanto em espécies sexuais quanto apomíticas, apresente uma regulação fina envolvendo diferentes mecanismos de sinalização. Até o presente momento, apesar da identificação de uma série de sequências potencialmente relacionadas à apomixia, não foi possível identificar e caracterizar os elementos chave que regulam o desenvolvimento apomítico. São necessários, portanto, mais estudos de identificação e também de caracterização dessas sequências já descritas como diferencialmente expressas em órgãos reprodutivos de plantas apomíticas e sexuais nas várias espécies utilizadas como modelo de estudo. O estudo envolvendo estrutura, expressão e aspectos funcionais dos genes do tipo MADS-Box em plantas que apresentam reprodução apomítica apospórica é um trabalho pioneiro que poderá ainda contribuir na compreensão dos processos envolvidos na diferenciação da reprodução sexual e apomítica, na interação entre os tecidos esporofítico e gametofítico no comprometimento de células específicas do óvulo para o destino somático, meiótico ou para o desenvolvimento apomítico e na relação funcional entre os diferentes processos de reprodução por semente e entre os reguladores do ciclo celular.

### **1.5. Genes do tipo MADS-Box**

Fatores de transcrição do tipo MADS-box estão envolvidos em diversos aspectos do desenvolvimento da planta incluindo a diferenciação de células do óvulo, regulação da indução do florescimento, fertilidade, desenvolvimento de óvulo e do fruto, identidade do órgão floral e do meristema e alongamento e expansão da raiz lateral (Bowman & Meyerowitz, 1991; Coen & Meyerowitz, 1991; Zhang & Forde, 1998; Causier et al., 2002; Matias-Hernandez et al., 2010).

O nome MADS é um acrônimo formado pelas iniciais dos primeiros quatro membros da família de genes analisados: MINICHROMOSSOMO MAINTENANCE1 (MCM1) de *Saccharomyces cerevisiae* (Passmore et al., 1988); AGAMOUS (AG) de *Arabidopsis thaliana* (Yanofsky et al., 1990); DEFICIENS (DEF) de *Antirrhinum majus* (Sommer et al., 1990) e SERUM RESPONSE FACTOR (SRF) de *Homo sapiens* (Norman et al., 1988).

As proteínas MADS-Box são classificadas de acordo com os domínios que possuem. SERUM RESPONSE FACTOR-like (SRF-like) e proteínas que possuem somente o domínio MADS (M), constituem o Tipo I. Aquelas que possuem os domínios MIKC e proteínas MYOCYTE ENHANCER FACTOR2-like (MEF2-like) formam o Tipo II (Alvarez-Buylla et al., 2000). O tipo MIKC é exclusivo em plantas e caracterizado pelos quatro domínios: MADS-Box (M); Intervening (I); Keratin-like (K) e C-terminal (C) (Theissen et al., 1996).

Apesar de MADS-Box do tipo I representarem mais de 60% dos genes que compõem a família MADS-Box, pouco se sabe ainda sobre esse grupo de genes (Colombo et al., 2008). Um dos motivos para o pouco conhecimento do papel desses genes em plantas é seu baixo nível de expressão e em poucas e específicas células em um limitado intervalo de tempo (Kohler et al., 2003; Portereiko et al., 2006; Bemer et al., 2008; Kang et al., 2008; Steffen et al., 2008; Bemer et al., 2010). Além disso, os mutantes de *Arabidopsis* obtidos por inserção de T-DNA, apesar de terem sido extensivamente estudados, não apresentaram fenótipos evidentes devido a uma recente duplicação intracromossomal em MADS-Box do tipo I (De Bodt et al., 2003; Parenicova et al., 2003; Bemer et al., 2010). Esses genes são preferencialmente expressos em três tipos de células do gametófito feminino e da semente: antípodas, célula central e região chalazal do endosperma e estão relacionados com a formação do endosperma (Bemer et al., 2010).

Considerando a proteína do tipo MIKC (Fig.4), o domínio M, de aproximadamente 56 resíduos de aminoácidos, é responsável pela associação da proteína ao DNA em uma região do promotor constituída por CC(A/T)6GG, conhecida como CArG-box (Riechmann et al., 1996). O domínio K possui uma estrutura *super coiled-coil* e facilita a dimerização (Yang, 2004), que é especificada pelo domínio I - pouco conservado (Davies et al., 1996). O

domínio C-terminal é o mais divergente entre os diferentes tipos de MADS-box, mas apresenta domínios conservados entre os membros que compõem o mesmo clado (Davies & Schwarz-Sommer, 1994), determinando suas funções biológicas divergentes, formando possivelmente redes de interações específicas (Egea-Cortines et al., 1999; Honma & Goto, 2001).

**Figura 4 .** Modelo de interação dos fatores de transcrição MADS-box adaptação de Causier et al., 2010. O domínio MADS reconhece a sequência de DNA. Os domínios I e K formam os dímeros e o domínio C está envolvido na formação do complexo multimérico.

### 1.5.1. MADS-Box em plantas

As angiospermas apresentam constância na sequência concêntrica de verticilos. A Figura 5 representa a organização das flores em mono- (A) e dicotiledôneas (B). Em dicotiledôneas, as flores são organizadas em quatro camadas concêntricas de sépalas, pétalas estames e carpelo (Fig.5B). As sépalas representam a camada mais externa (Bowman, 1997). Apesar de as flores em gramíneas apresentarem estruturas diferenciadas como pálea, lema e lodículas, estudos de mutantes de genes ortólogos de MADS-Box em arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*), representantes da família Poaceae, sugerem paralelismo da organização dos órgãos florais entre gramíneas e dicotiledôneas (Shimamoto & Kyojuka, 2002) (Fig. 5A, B). A lema e a pálea correspondem às glumas e sépalas, respectivamente, e as lodículas às pétalas (Favaro et al., 2002).

A família Poaceae de monocotiledôneas é composta por 10.000 espécies e representa um dos grupos de angiospermas mais interessantes devido à diversidade morfológica, à sistemática, à ecologia e à importância econômica (Ciaffi et al., 2011). A estrutura floral de gramíneas é bastante peculiar em comparação à estrutura da flor de dicotiledônea, pois não apresenta pétalas e sépalas. Os órgãos reprodutivos são circundados por duas lodículas, que corresponderiam às pétalas, e são responsáveis pela abertura da flor durante a antese (Clifford, 1987).

Devido à facilidade de manipulação genética, o mecanismo molecular que regula o desenvolvimento floral foi estudado inicialmente em *A. thaliana* e *Antirrhinum majus*, dicotiledôneas típicas que possuem o meristema floral organizado como apresentado na figura 5A (Coen & Meyerowitz, 1991; Riechmann & Meyerowitz, 1997; Bowman et al., 1999). A aplicação da genética reversa permitiu a elaboração do modelo ABC que se baseia na modulação de genes MADS-Box que, agindo em combinação, conferem identidade dos órgãos florais (Coen & Meyerowitz, 1991), como apresentado na Figura 5C (em monocotiledôneas) e 5D (em dicotiledôneas).

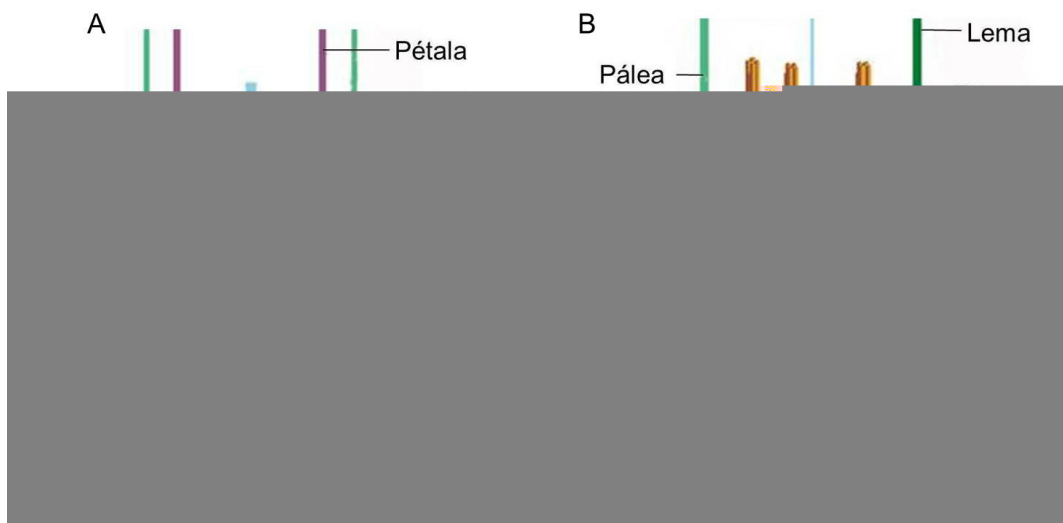
A identidade de cada órgão floral é definida por uma combinação única de três classes de genes de identidade floral A, B e C. MADS-Box da classe A (*APETALA2*) especificam a formação de sépalas. A combinação de A e B (*APETALA3* e *PISTILLATA*) determina o desenvolvimento de pétalas e a combinação de B e C (*AGAMOUS*) forma estames. A expressão de somente genes da classe C especifica a formação de carpelo. As classes de genes A e C são antagônicas, a ausência de A determina a expressão de C por todo os órgãos florais e vice-versa (Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel & Meyerowitz, 1994) (Fig. 5D).

Devido à complexidade do desenvolvimento floral e à variabilidade das angiospermas, tornou-se necessária a adição de duas novas funções no modelo original ABC, funções D e E. A função D (*SEEDSTICK*, em *Arabidopsis*) foi adicionada como resultado de estudos relacionados ao desenvolvimento de óvulo em *Petunia* (Angenent et al., 1995; Colombo et al., 1995; Angenent & Colombo, 1996; Theissen, 2001). 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. A expressão ectópica de *SEP* juntamente com outros genes da classe A e B gerou a metamorfose de folhas em pétalas (Pelaz et al., 2000; Honma & Goto, 2001; Pelaz et al., 2001). Esses experimentos demonstraram claramente que pétalas são folhas modificadas. A classe E, portanto está envolvida na formação de sépala, pétala, carpelo, estame e óvulo (Fig. 5D) (Weigel & Meyerowitz, 1994; Angenent & Colombo, 1996; Theissen, 2001; Kater et al., 2006).

Posteriormente, o modelo ABCDE também passou a ser estudado em monocotiledôneas e percebeu-se que os diversos genes requisitados para a produção do órgão floral de dicotiledôneas também são responsáveis pela formação do órgão floral de gramíneas. Entretanto, alguns genes se apresentaram únicos ou com funções diversificadas em monocotiledôneas. Os genes das classes C/D de MADS-Box apresentaram diversos processos evolutivos como sub-funcionalização e neo-funcionalização. Alguns desses eventos ocorreram após a diferenciação de dicotiledôneas e monocotiledôneas gerando diferentes funções (Scutt et al., 2006). Em *A. thaliana* o clado C/D é suficiente para determinar a identidade do carpelo. Enquanto que arroz requer ainda a ação do gene homeótico *DROOPING LEAF (DL)* da família YABBY (Scutt et al., 2006; Li et al., 2011b) (Fig. 5C).



**Figura 5.** Esquema da organização floral e modelo ABCDE em monocotiledôneas (A e C) e dicotiledôneas (B e D) adaptado de (McSteen et al., 2000; Krizek & Fletcher, 2005). pa: pálea; lo: lodícula; st: estame; ca: carpelo; se: sépala; pe: pétala.

### 1.5.2. Papel de MADS-Box na identidade e desenvolvimento do óvulo e apomixia

Apesar do extenso conhecimento a respeito de MADS-Box, pouco se sabe sobre os elementos *cis* aos quais essas proteínas se ligam. O genoma de *A. thaliana* apresenta uma grande frequência de CArG box excedendo o número total de genes, mas sua simples presença não indica que esses genes são alvos de MADS-Box (Folter & Angenent, 2006).

Com os avanços biotecnológicos no estudo de proteínas descobriu-se que genes MADS-Box, além de serem autoreguláveis, regulam também outros fatores de transcrição,  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas e proteínas envolvidas em transdução de sinal, organogênese floral e metabolismo de hormônios (Bowman & Smyth, 1999; Sakai et al., 2000; Bey et al., 2004; Ito et al., 2004; Wang et al., 2004).

SEEDSTICK (STK), SHATTERPROOF1 (SHP1) e SHATTERPROOF2 (SHP2) são proteínas do tipo MADS-Box capazes de formar um complexo multimérico juntamente com AGAMOUS (AG) e SEPALLATA3 (SEP3) em *A. thaliana* (Favaro et al., 2003).

Recentemente, em *Arabidopsis*, foi demonstrado que *VERDANDI*, um gene da super-família B3, é um alvo direto deste complexo, afetando a identidade de antípodas e sinérgides. Essas evidências apontam que os fatores de transcrição MADS-box estão envolvidos na ontogênese do saco embrionário (Matias-Hernandez et al., 2010).

O triplo mutante *stk, shp1, shp2* apresentou conversão homeótica de óvulos em estruturas carpelóides (Pinyopich et al., 2003). Proteínas homólogas de SEEDSTICK em arroz (OsMADS13) e em petúnia (FPB7 e FPB11) também demonstraram interação com proteínas do tipo SEPALLATA (Favaro et al., 2002), evidenciando que as interações entre diferentes proteínas MADS-Box em monocotiledôneas e dicotiledôneas também são conservadas (Moon et al., 1999; Favaro et al., 2002; Fornara et al., 2004). No entanto, ainda há poucos relatos demonstrando envolvimento de genes do tipo MADS-Box em plantas com diferentes modos de reprodução durante a diferenciação do SE.

Guerin e colaboradores, em 2000, foram os primeiros a descreverem uma redução da expressão do homólogo de *DEFICIENS*, gene MADS-box da classe B, durante iniciação da apomixia em óvulos de *Hieracium*. Posteriormente descobriu-se também que alguns MADS-Box são precocemente expressos em

duas espécies apomíticas de *Boechea* (Carman, 2008). O SE do tipo apomítico de *Boechea* e *Hieracium*, entretanto, não são morfologicamente diferentes do SE do tipo sexual, como acontece em *Brachiaria*, dificultando o estudo comparativo entre apomixia e sexualidade.

A descoberta de vias alternativas que podem estar envolvidas na diferenciação do SE do tipo apomítico seria melhor evidenciada com o estudo em espécies de plantas que apresentam SEs morfologicamente diferenciais. Esse é o caso de *Brachiaria*, onde plantas apomíticas apresentam SE do tipo *Panicum* e sexuais do tipo *Polygonum*.

## **2. Objetivo geral**

O objetivo geral do trabalho é identificar sequências do tipo MADS-Box em órgãos florais em um sistema agâmico de plantas apomíticas e sexuais, *B. brizantha* e estudar o seu envolvimento com a formação de megagametófitos de plantas apomíticas e sexuais em *B. brizantha* e em *Arabidopsis*.

### **2.1. Objetivo específico**

Como objetivos específicos, visa-se clonar genes MADS-box das classes C e E, analisar o padrão de expressão desses genes nos órgãos florais, avaliar a formação de dímeros envolvidos na determinação de carpelo e óvulos e analisar o ganho de função de genes do tipo MADS-box de *B. brizantha* e de *Arabidopsis* durante a expressão ectópica em tecidos envolvidos na formação do megagametófito.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material Vegetal

Tecidos vegetativos e reprodutivos foram extraídos de plantas dos acessos de *B. brizantha*: BRA 00591- B30, tetraplóide ( $2n=4X=36$ ), apomítica, cv. Marandu e BRA 002747- B105, sexual diplóide ( $2n=2X=18$ ), cultivadas em campo e em casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Raízes foram coletadas de plantas em casa de vegetação, folhas jovens e flores de plantas em campo. Ovários em megasporogênese e megagametogênese foram extraídos dos racemos utilizando estereoscópio Stemi SV6 (Fig. 6) e classificados de acordo com (Araújo et al., 2000b).



**Figura 6.** Pistilos de *B. brizantha* nos estádios de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (III e IV) e os processos morfológicos envolvidos em cada estágio de desenvolvimento do ovário de plantas sexuais e apomíticas. adaptado de Rodrigues et al., 2003. Nas plantas sexuais ocorre meiose na célula-mãe do megásporo, o megásporo sobrevivente após três mitoses e diferenciação celular formará o saco embrionário do tipo *Polygonum*. Nas plantas apomíticas ocorre em paralelo, diferenciação de células apospóricas iniciais (ai) a formação de sacos embrionários do tipo *Panicum*, após duas mitoses. Barra: 1mm.

Plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia foram utilizadas para produção de plantas transgênicas. As plantas foram crescidas em sala de cultura a 22°C, em condições de dias longos (16h de luz/8h no escuro), sob intensidade luminosa de 250  $\mu$ Einstein m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, em mistura de solo e vermiculita 2,5:0,5.

### **3.2. Extração de RNA total de ovários e anteras de *B. brizantha***

Para extração de RNA foram coletados 250 ovários por tubo de microcentrífuga, congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Foram coletadas 200 anteras dos estádios iniciais de desenvolvimento dos pistilos (I e II separadamente) e 100 anteras referentes ao estágio de desenvolvimento tardio (III e IV separadamente). Ovários ou anteras de *B. brizantha* mantidos a -80° C foram homogeneizados em 250  $\mu$ L de Trizol<sup>®</sup> (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  $\mu$ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), livre de RNase em agitador Vortex. Após a incubação no gelo por 5 min, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 min (centrífuga Eppendorf 5415C) a 4° C e o sobrenadante transferido para um tubo novo de 1,5 mL. A precipitação foi feita utilizando um volume de isopropanol por 30 min a 4° C. Em seguida, centrifugou-se por 15 min a 13.000 rpm a 4° C. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70%, v/v, gelado e ressuspenso em 10  $\mu$ L de água tratada com DEPC 0,1%, v/v.

A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% , p/v, corado com brometo de etídio 0,5  $\mu$ g/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) e quantificada em NanoDrop por espectrofotometria.

### **3.3. Extração de RNA total de folhas e raízes de *B. brizantha***

Folhas e raízes foram coletadas pela manhã para evitar acúmulo de resíduos e produtos da fotossíntese 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 min à temperatura ambiente, 6 mL de fenol ácido: clorofórmio: álcool isoamílico

(25:24:1) e 9 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M; EDTA 1 mM pH 8,0; SDS 1%, p/v). O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min em centrífuga Sorvall SS34. A fase aquosa foi transferida para tubos novos e precipitada por pelo menos 1 hora com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 4,5 e com 2 volumes de etanol absoluto gelado a -20° C. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min e o precipitado dissolvido em 2,5 mL de água gelada tratada com DEPC 0,1% (v/v) e precipitado novamente com 2,5 mL de cloreto de lítio 4 M a 4° C por 16 h. Foi feita, em seguida, uma centrifugação a 10000 rpm por 15 min a 4° C e o precipitado foi ressuspendido em 1,8 mL de água tratada com DEPC 0,1% (v/v).

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 min a 10.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) e ressuspendido em 200 µL de água gelada, tratada com DEPC 0,1 % (v/v).

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

### 3.4. Clonagem de MADS-Box utilizando iniciadores degenerados

Os iniciadores degenerados, apresentados na tabela 1, foram utilizados juntamente com Oligo-dT para amplificar as sequências *BbrizAG* e *BbrizSEP* de plantas apomíticas e sexuais usando a técnica de *touchdown* como descrita em Tzeng & Yang, 2001.

**Tabela 1.** Sequências dos iniciadores utilizados na clonagem de *BbrizAG* e *BbrizSEP*

| Iniciador | Gene            | Sequência                     |
|-----------|-----------------|-------------------------------|
| 5M7       | <i>BbrizAG</i>  | 5'- GCTCTCTGTNCTITGYGAYGC -3' |
| 5M3       | <i>BbrizSEP</i> | 5'- AARATHAAYCGNCARGTNACC -3' |

N = A, C, G, T; Y = C, T; R = A, G; H = A, T, C.

### 3.5. Reação de 5' RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends

As reações de 5'RACE foram feitas de acordo com o fabricante *Marathon™ cDNA Amplification Kit* (Clontech) utilizando mRNA de ovários de planta apomítica e sexual nos estádios I e II e no estádio IV purificado com o *Kit Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub> Dynal®*, seguindo instruções do fabricante. A primeira reação de amplificação da porção 5' UTR foi feita em um volume final de 50 µL contendo 5 µL do tampão *High Fidelity 10X*, 2 µL (2 mM) de MgSO<sub>4</sub> (50 mM) e 0,2 µL da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (5 U/ µL) (Invitrogen™), 5 µL (0,5 ng) de cDNA de ovários de *B. brizantha* estádio IV ou nos estádios I e II, 1 µL do iniciador AP1 e 1 µL do iniciador gene-específico (Tabela 2).

As condições de amplificação utilizadas foram: 1 minuto a 94º C; 4 ciclos de 30 s a 94º C e 4 min a 72º C; 4 ciclos de 30 s a 94º C e 4 min a 70º C; 34 ciclos de 20 s a 94º C e 4 min a 68º C, em termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems).

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), para facilitar a separação de bandas, corado com brometo de etídio (0,5 µg/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).

Os fragmentos amplificadas foram excisados e eluídos do gel utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean up System* (Promega) segundo recomendações do fabricante. Para segunda reação, os mesmos parâmetros foram utilizados, acrescentando-se à reação 5 µL de uma diluição de 50X do produto purificado da primeira. A análise do produto da segunda reação e sua purificação foram realizadas como descrito para a primeira reação e clonadas no vetor pGEM®-T *Easy* (Promega), conforme orientação do fabricante.

O produto da transformação em células XL1 Blue de *E. coli* foi distribuído em placa contendo 20 mL de meio sólido LB com ampicilina na concentração de 100 mg/L. As colônias positivas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/L para mini-preparação de DNA plasmidial e sequenciamento.

**Tabela 2.** Sequências dos iniciadores utilizados nos experimentos de 5'RACE

| Gene             | Iniciador     | Sequência                          |
|------------------|---------------|------------------------------------|
| <i>BbrizAGL6</i> | CONT38AG140R  | 5' – CTTGTTCTCGATCCGCTTCAGCTC – 3' |
|                  | CONT38AG101R  | 5' – CATGGTGGCTGATGGCTCTCTC –3'    |
|                  | CONT38AG50R   | 5' – TCTCTGCCTGCTGGTGAT – 3'       |
| <i>BbrizSEP2</i> | CONT119AG30R  | 5' – GACCTGGCGGTTGATCTTGTTC – 3'   |
|                  | CONT119AG123R | 5' – GTTGGAGAAGATGATGAGCGCGAC – 3' |
| <i>BbrizAG</i>   | 5B30M7GSP2    | 5'-GATGTGTCACTGTTGGCCTTCTTG-3'     |
|                  | 5B30M7GSP3    | 5'-CTCGGCGTCACACAGTACAGAGAGC-3'    |
|                  | 5M7GSP4       | 5'-GACTTGCCGGTTGGTGGTGTCT-3'       |
|                  | 5M7GSP5       | 5'-TTGAGCATGGATGGTATGGCAGTG-3'     |

### 3.1. Minipreparação de DNA plasmidial

As culturas de bactérias transformadas com os clones em estudo foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico adequado em um tubo Falcon<sup>®</sup> por 16 h 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 microcentrifuga 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 min, foram adicionados 200 µL de solução II preparada na hora (NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v)) e a solução foi misturada ao material vertendo o tubo 3 vezes. A solução foi mantida por 5 min 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 destilada). Após 5 min no gelo a mistura foi centrifugada por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e precipitado com dois volumes de etanol absoluto por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugado por 10 min a 13.000 rpm e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi lavado com 800 µL de etanol



70% (v/v). Após a secagem do material, o DNA foi ressuscendido em 30  $\mu$ L de água deionizada.

### **3.2. Análises filogenéticas**

As sequências MADS-box de gramíneas e outras espécies de plantas foram obtidas em bancos de dados não redundante como *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os alinhamentos foram gerados pelo ClustalW (Thompson et al., 1994) de acordo com (Ohmori et al., 2009). O software The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 2.0 (Kumar et al., 2000) foi usado para gerar as árvores filogenéticas utilizando sequências de aminoácidos deduzidos.

As sequências 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 sequências de resíduos de aminoácidos contendo os domínios M, I, K e C. A solidez da árvore foi feita com a ferramenta bootstrap (1.000 replicações).

### **3.3. Hibridização in situ**

#### **3.3.1. 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 estádios de desenvolvimento (Araújo et al., 2000b) foram coletados, com o auxílio de microscópio estereoscópico Zeiss-Stemi SV11, colocados em solução fixadora contendo glutaraldeído 0,25% (v/v), paraformaldeído 4% (v/v) 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 e anteras mantidos na nova solução por 16 h a 4<sup>o</sup> 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% (v/v), 30 min cada. O material que não foi usado no momento foi armazenado a -20<sup>o</sup> C em álcool etílico 70% (v/v).

### 3.3.2. 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% (v/v) 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% (v/v), 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% (v/v) (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% (v/v) (10 min cada).

### 3.3.3. Síntese das sondas marcadas com digoxigenina

Foi utilizado como molde para a sonda o mesmo fragmento utilizado para PCR em tempo real (RT-qPCR) na região C-terminal de *BbrizAGL6* amplificada com os iniciadores RT38R1 e RT38F1 (Tabela 1). No caso de *BbrizSEP2*, duas sondas diferentes foram utilizadas. A primeira reação de hibridização in situ foi feita com o mesmo fragmento amplificado na RT-qPCR utilizando os iniciadores RT119R1 e RT119F1 (Tabela 1). Na tentativa de aperfeiçoar o sinal de detecção da hibridização in situ, outra sonda foi realizada com os iniciadores 5'– AACTAGAGGAGAGCAACCAGGTTAT – 3' e 5' - ATGAACTAGTCAGCGCCTCAGAA - 3'. Os produtos da PCR foram clonados no vetor *pGEM*® -T Easy Vector Systems (Invitrogen®) e mantido em bactérias XL1 Blue de *Escherichia coli* estocadas em glicerol 20% (v/v) a -80°C. Os plasmídeos contendo o fragmento de cDNA referente a *BbrizAGL6* e a *BbrizSEP2* foram amplificados utilizando os iniciadores nas regiões promotoras T7 e SP6 nas seguintes condições: 2 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C e 30 s a 72°C; 5 min a 72°C. As sondas de RNA, senso e anti-senso, foram sintetizadas por transcrição in vitro utilizando o DIG RNA Labeling Kit® (Roche), a partir do produto de amplificação com os iniciadores nas

regiões T7 e SP6. Foram utilizadas as enzimas RNA polimerase T7 para produzir a sonda anti-senso e SP6 para produzir a sonda senso.

### **3.3.4. Reação de hibridização**

As secções foram incubadas com 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL<sup>®</sup>), 60 ng de sonda em 100 µL de tampão de hibridização [Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 300 mM; formamida 50% (v/v); EDTA 1 mM pH 8,0; mistura de Denhardt 1X (solução de Denhardt 100X = Polyvinylpyrrolidone 2% (p/v); BSA 2% (p/v) e Ficoll™ 400 2% (p/v)); sulfato de dextran 10% (p/v)]. As secções foram colocadas em câmara úmida a 42°C, no escuro, por um período de 16 h.

### **3.3.5. 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 Na<sub>3</sub>-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<sup>®</sup>). 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 MgCl<sub>2</sub>) 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 Axiophot (Zeiss), as secções foram lavadas em água bi-destilada, desidratadas em série crescente de álcool etílico (30, 50, 70, 90 e 100%, v/v); álcool etílico:xileno (1:1; v/v) e xileno puro por 30s cada e montadas com Permount<sup>®</sup> SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific).

### 3.4. Reação de PCR em tempo real, RT-qPCR

O RNA total foi tratado com DNase (Amersham™) utilizando 0,5 U de enzima/μg de RNA e purificado com o fenol e clorofórmio. Para reação de RT-qPCR em *B. brizantha*, foram utilizados cDNAs sintetizados por transcrição reversa a partir de 1,5 a 2 μg de RNA total de ovário e antera em diferentes estádios de desenvolvimento, flor, 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 3.2 e 3.3. A reação de RT-qPCR foi feita em um volume final de 20 μL, utilizando 5 μL da diluição do cDNA fita simples 1:100. Para cada reação foram utilizados 10 μL do kit *Syber Green Rox Plus* (LGCBIO™) e 0,2 μM de cada iniciador. O software *Primer 3.0* (Rozen & Skaletsky, 2000) foi utilizado para o desenho dos iniciadores para RT-qPCR (Tabela 3), nas seguintes condições: tamanho do amplicom entre 100 e 200 pb, temperatura de anelamento (T<sub>m</sub>) entre 59°–60°C, e tamanho dos iniciadores entre 20–23 pb. Apenas os iniciadores para *BbrizAG1* e *BbrizAG2* apresentaram temperatura de *melting* entre 47° - 57° C. As reações foram feitas sob as seguintes condições, no equipamento *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf™), 15 min a 95° C; 40 ciclos de 15 s a 95° C, 15 s a 58° C, 20 s a 72° C. A curva de dissociação foi feita de 60° C a 95° C, por 20 min, após ter passado por 95° C por 15 s e 60° C por 15 s. O gene referência para *B. brizantha*, fator de conjugação de ubiquitina (UBCE), foi previamente determinado (Silveira et al., 2009). A eficiência dos iniciadores utilizados para amplificar *BbrizAGL6* e *BbrizSEP2* foi de 99% e 150%, respectivamente. A eficiência dos iniciadores para amplificar o gene de referência foi 100%. A eficiência dos iniciadores para *BbrizAG1* e *BbrizAG2* não foi testada.

RNA total de flores jovens, ainda fechadas, de *Arabidopsis* foi extraído de acordo com (Verwoerd et al., 1989) e a retrotranscrição feita com SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen™). O gene de referência utilizado foi UBIQUITINA. RT-qPCR foi conduzida em triplicata utilizando o kit *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) em Bio-Rad *iCycler iQ Optical System* (software version 3.0a). Os iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos *BbrizAGL6* (RT515, RT516) e de *AGL6* (RT478 e RT479) estão

descritos na Tabela 3. A eficiência dos iniciadores para amplificar *BbrizAGL6* e *AGL6* foi 112% e 124%, respectivamente. A eficiência dos iniciadores para amplificar o gene de referência foi 100%. As reações foram feitas em triplicata para cada tecido e com uma repetição biológica.

**Tabela 3.** Sequências dos iniciadores utilizados em RT-qPCR para amplificar genes de *Brachiaria (Bbriz)* e de *Arabidopsis*.

| Gene             | Iniciador | Sequência                      |
|------------------|-----------|--------------------------------|
| <i>BbrizAGL6</i> | RT38R1    | 5'-CCATCCCAGCATGAAGTTG -3'     |
|                  | RT38F1    | 5'- TCTGCAAATCGGGTATCCTC -3'   |
|                  | RT515     | 5'-CAGCAACTACAGAACCTTGACAG-3'  |
|                  | RT516     | 5'-CTCAGAAGGCAGAACTGATGAT-3'   |
| <i>BbrizSEP2</i> | RT119R1   | 5'- GCCGCCGCATCCTTATTAT -3'    |
|                  | RT119F1   | 5'- CCTTCTGAGGCGCTGACTA -3'    |
| <i>BbrizAG1</i>  | M7F534    | 5'- AGCCTCAGCATTACTCCCATC -3'  |
|                  | M7R643    | 5'- GTTCTGATCTTGATTGGTCACA -3' |
| <i>BbrizAG2</i>  | M7F531    | 5'- TGCAGGAGCCTCAACATTACT -3'  |
|                  | M7R665    | 5'- TTTTGTCTTGATTGGTTCA -3'    |
| <i>BbrizUBCE</i> | UBCE-F    | 5' – GGTCTTGCTCTCCATCTGCT-3'   |
|                  | UBCE-R    | 5' – CGGGCTGTCGTCTCATACTT-3'   |
| AGL6             | RT478     | 5'-ACCTTTCAAGACTTATGGGCAAA-3'  |
|                  | RT479     | 5'-CACGTAGTAATGTTGTTGAAACCC-3' |
| UBIQUITINA       | RT147     | 5'-CTGTTACGGAACCCAATTC-3'      |
|                  | RT148     | 5'-GGAAAAAGGTCTGACCGACA-3'     |

### 3.5. Transformação em pequena escala de levedura

O inóculo de levedura *Saccharomyces cerevisiae* AH109 em 50 mL meio YAPD foi deixado sob agitação a 28°C por 16 h e centrifugado por 4 min a 4000 rpm. As células foram lavadas em 1 mL de água deionizada estéril e centrifugadas a 13.000 rpm por 30 s. Em seguida as células foram ressuspendidas em 500 µL de solução LiAc/TE (acetato de lítio 1X; TE 1X) e

centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 30 s. As células foram ressuspendidas em 1.5 mL de solução LiAc/TE.

Foram utilizados 50 µL da cultura de levedura para cada transformação, adicionando-se em seguida 1 µL de solução contendo cada vetor na concentração aproximada de 50 ng/µL, 7 µL de DNA de esperma de salmão 10 mg/mL, 7 µL de DMSO e 300 µL da solução PEG /LiAc/TE (PEG 4000 40%, p/v; TE 1X; LiAC 1X). Em seguida, as células foram submetidas ao choque térmico que consiste em incubação de 30 min a 30°C e 15 min a 42°C. Após a transformação por choque térmico, as células foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 s, ressuspendidas em 50 µL de água deionizada estéril e plaqueadas em meio Yeast Synthetic Dropout (YSD) sólido suplementado com glicose 2% (p/v) e dropout 1X sem triptofano e leucina pH 5,8 para seleção dos transformantes.

Soluções-estoque para transformação de levedura:

LiAc 10X: 1M de acetato de lítio, pH 7,5;

Tampão TE 10X: Tris-HCl 0,1 M (pH 7.5), EDTA 10 mM;

Dropout 10X: L-isoleucina 300mg/L; L-valina 1500mg/L; L-adenina hemissulfato 200 mg/L; L-arginina HCl 200 mg/L; L-histidina HCl monohidratada 200mg/L; L-leucina 1000 mg/L; L-lisina 300 mg/L; L-metionina 200mg/L; L-fenilalanina 500 mg/L; L-treonina 2000 mg/L; L-triptofano 200 mg/L; L-tirosina 300 mg/L; L-uracila 200 mg/L.

### **3.6. Ensaio de duplo híbrido**

Sequências codificadoras dos genes utilizados nos ensaios de duplo híbrido foram clonadas em vetores *Gateway* no sistema GAL4 utilizando vetores adaptados de pADT7 (Clontech) para o domínio de ativação e pGBKT7 (Clontech). O sistema GAL4 consiste na habilidade de dividir o ativador de transcrição de eucariotos em dois domínios, o domínio de ligação (BD) e o domínio da ativação transcricional (AD). Neste sistema, sequências de DNA que codificam proteínas da biblioteca de interesse (Y) são inseridas no vetor pGAL4 contendo o domínio AD. A sequência de DNA que codifica a proteína que será usada como isca é inserida no vetor pGAL4 contendo o domínio de ligação ao DNA BD (X). Esses vetores são introduzidos em levedura por transformação e quando ocorre interação específica entre X e Y, o fator de

ativação de transcrição fica completo e a transcrição do gene repórter é iniciada.

Ensaio de duplo híbrido foram feitos usando a linhagem AH109 de *Saccharomyces cerevisiae*. Leveduras contendo os vetores pBD ou pAD com a região codificadora dos genes de interesse foram selecionados em meio YSD na ausência de leucina (Leu) e triptofano (Trp), respectivamente. Interações de duplo híbrido foram analisadas dois meios YSD seletivos, o primeiro ausente de Leu, Trp e adenina; e o segundo ausente de Leu, Trp e histidina (His) suplementado com 3-aminotriazol na concentração [5 mM]. O cDNA dos genes estudados foram amplificados por PCR utilizando iniciadores específicos contendo sequências attB1 e attB2 para a recombinação homóloga.

Clonagem de sequências codificadoras de AG, SHP1, SHP2 e STK nos vetores AD e BD foram previamente descritos (Favaro et al., 2003). O fragmento de cDNA de SEP3 $\Delta$ 192 foi amplificado e clonado de acordo com (Brambilla et al., 2007). As sequências codificadoras de *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2*, *AGL6*, *BbrizAGL6* foram amplificadas utilizando iniciadores de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4.** Sequências dos iniciadores utilizados na clonagem de *AGL6*, *BbrizAG*, *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6*

| Gene             | Iniciador | Sequência   |
|------------------|-----------|---|
| <i>AGL6</i>      | AtP3094   | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG<br>CTCGATGGGAAGAGGGAGAGTG - 3'     |
|                  | AtP3095   | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG<br>GTGTCAAAGAACCCAACCTTGGACG - 3'  |
| <i>BbrizAG</i>   | AtP_3143  | 5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG<br>GCTCCACTGATCTGAGCTGCGGG - 3'    |
|                  | AtP_3144  | 5' - GGGACCACTTTGTACAAGAAAGC<br>TGGGTGTCATCCGAGTTGAAGGGTTG - 3'   |
| <i>BbrizSEP2</i> | AtP_3141  | 5' - CACCATGGGAAGAGGACGAGTGGAG<br>CTGAAGCGGA - 3'                 |
|                  | AtP_3142  | 5' - GATCTCATGGCAACCATGG - 3'                                     |
| <i>BbrizAGL6</i> | AtP_3139  | 5' - GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTC<br>CATGGGGAGGGGACGGGTC - 3'   |
|                  | AtP_3140  | 5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG<br>TCAAAGAACCCATCCCAGCATG - 3' |

### 3.7. Clonagem do promotor *WM*

O promotor do gene WM403 de *Citrullus lanatus* foi clonado de acordo com Dwivedi e colaboradores, 2010, e inserido no vetor NOB1161 derivado de pK2GW7 cedido pela Dr<sup>a</sup>. Lucia Colombo, Università degli Studi di Milano, Milão, Itália.

### 3.8. Construção dos vetores binários

Para a expressão ectópica de *AGL6* e *BbrizAGL6* em *Arabidopsis*, cDNA foram clonados em vetores contendo os promotores pSTK (Kooiker et al., 2005) ou pWM. O gene repórter *GUS* foi fusionado aos vetores utilizados para verificar a atividade dos promotores pSTK e pWM. As regiões codificadoras de



*AGL6* e *BbrizAGL6* foram amplificadas com os iniciadores descritos na tabela 4 e clonados nos vetores NOB936 (derivado de pGWB) (Nakagawa et al., 2007) e NOB1510 derivado de pK2GW7 passando pelo vetor pDONOR 207 (Life Technologies, Carlsbad,CA). Vetores binários foram utilizados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

### **3.9. Transformação de *A. thaliana* por imersão de botões florais.**

#### **3.9.1. Preparo das plantas**

As plantas foram crescidas em vasos em sala de cultura a 22°C, em condições de dias longos (16h de luz/8h no escuro), sob intensidade luminosa de 250  $\mu$ Einstein m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, em mistura de solo e vermiculita 2,5:0,5. Após 25 dias depois da germinação, ao aparecer o primeiro botão floral, este era cortado para quebrar a dominância apical. O mesmo procedimento foi repetido após três a cinco dias até apresentar inflorescências secundárias entre um a dez centímetros de altura. As flores abertas e as sílicas foram retiradas antes de se realizar a infiltração com *Agrobacterium tumefaciens*.

#### **3.9.2. Imersão de botões florais de *Arabidopsis*.**

A transformação de *Arabidopsis* foi feita de acordo com Clough & Bent (1998). O inóculo da cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo o vetor desejado foi feito em 300 mL de meio LB contendo parte do pré-inóculo que foi deixado sob agitação e cultivado por 16 h a 28°C. Após 16 h sob agitação a 28°C, o inóculo foi centrifugado por 30 min a 4000 rpm. A parte apical das plantas, ainda plantadas em vasos, foram imersas em béquer contendo as bactérias em meio de infiltração (sacarose 5%, p/v; Silwet L-77 0,05%, v/v) por 20s. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 h. Após o amadurecimento das sílicas as sementes foram coletadas e armazenadas a 4°C ou germinadas após terem sido deixadas por 24 h a 37°C.

#### **3.9.3. Análise dos transformantes de *Arabidopsis***

As plantas potencialmente transformadas foram selecionadas após germinação com o herbicida FINALE (glufosinato) na concentração 0,03%, v/v. A detecção do transgene foi feita por PCR utilizando os iniciadores descritos na tabela 5.

**Tabela 5.** Sequências dos iniciadores utilizados na detecção dos transgenes pSTK::*BbrizAGL6*, pSTK::*AGL6*, pWM::*BbrizAGL6*, pWM::*AGL6*.

| Transgene               | Iniciador | Sequência  |
|-------------------------|-----------|--|
| pSTK:: <i>AGL6</i>      | AtP0140   | 5'- GAATTTCCCGAGAAAAGTTGG - 3'                                     |
|                         | AtP3095   | 5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT<br>GGGTGTCAAAGAACCCAACCTTGGACG - 3' |
| pSTK:: <i>BbrizAGL6</i> | AtP0140   | 5'- GAATTTCCCGAGAAAAGTTGG - 3'                                     |
|                         | AtP_3140  | 5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT<br>GGGTGTCAAAGAACCCATCCCAGCATG - 3'  |
| pWM:: <i>AGL6</i>       | AtP3500   | 5' - CTACGTTGATGCAATTTTGA - 3'                                     |
|                         | AtP3095   | 5' - GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT<br>GGGTGTCAAAGAACCCAACCTTGGACG - 3' |
| pWM:: <i>BbrizAGL6</i>  | AtP3500   | 5' - CTACGTTGATGCAATTTTGA - 3'                                     |
|                         | AtP_3140  | 5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT<br>GGGTGTCAAAGAACCCATCCCAGCATG - 3'  |

### 3.10. Clareamento de óvulos de *A. thaliana*

Em média, cinco sílicas de cada planta que apresentava a presença do transgene foram analisadas no microscópio estereoscópico Leica MZ6. Análises de óvulos em desenvolvimento de plantas transgênicas de *Arabidopsis* foram feitas com flores em solução de clareamento de acordo com Yadegari e colaboradores, 1994. Inflorescências foram fixadas em etanol: ácido acético na proporção 9:1 por 16 h, seguido de duas lavagens em etanol 90% e 70%, v/v. Sílicas foram clareadas em solução de hidrato de cloral: glicerol: água 8:1:2. Pistilos foram dissecados com o auxílio de um estereoscópio e observados em microscópio Zeiss Axiophot D1 equipado com contraste de interferência de fase diferencial (DIC). Imagens foram gravadas com câmera AxioCam MRc5 usando o programa Axiovision Zeiss (versão 4.1).

## 4. Resultados

### 4.1. Análises das sequências de genes MADS-box de *B. brizantha* em bancos de dados

Foram identificados em *B. brizantha* apomítica e sexual quatro genes do tipo MADS-Box: *BbrizAG*, *BbrizSEP*, *BbrizSEP2*, *BbrizAGL6* (Tabela 6). As sequências foram nomeadas de acordo com a similaridade encontrada no banco de dados NCBI, com o alinhamento e com a posição dessas sequências nas análises filogenéticas. Os cDNA *BbrizAGL6* (852pb) e *BbrizSEP2* (842 pb) foram isolados da biblioteca de cDNA de ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual (Silveira et al., 2012) e depositadas no banco de dados do NCBI com os números de acesso JG437109 e JG436343, respectivamente.

As regiões codificadoras de *BbrizAGL6* e *BbrizSEP2* estavam completas na biblioteca e experimentos de 5'RACE foram realizados para a obtenção da região 5'UTR e as sequências de nucleotídeos correspondentes a *BbrizAGL6* e *BbrizSEP2* passaram a apresentar 1159pb e 1004 pb, respectivamente. *BbrizAG* (776 pb) e *BbrizSEP* (363 pb) foram obtidos por meio de PCR utilizando iniciadores degenerados. Essas sequências não apresentavam a região codificadora completa e, 5'RACE foi realizado, sem sucesso para obtenção da sequência completa de *BbrizSEP*. As sequências *BbrizAG1* (845 pb) e *BbrizAG2* (1018 pb) são derivadas de *BbrizAG* após 5'RACE, clonagem e sequenciamento.

Análises comparativas entre sequências de *B. brizantha* apomítica e sexual apresentaram diferenças de alguns nucleotídeos nas sequências dos clones obtidos de *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2*, *BbrizSEP* e *BbrizAGL6*, tanto na região codificadora quanto na região 3'UTR, porém, essas alterações não afetaram as sequências de aminoácidos deduzidas que permaneceu idêntica, com exceção de *BbrizAG*. Devido às diferenças encontradas nas sequências referentes à *BbrizAG*, estas foram tratadas separadamente como: *BbrizAG1* e *BbrizAG2*.

**Tabela 6.** Comparação das sequências dos genes MADS-box identificadas em *B. brizantha* com os melhores resultados de sequências de monocotiledôneas obtidos em BLASTX .

| Seq.             | Tam.    | Descrição               | Espécie             | E-value           | Cob. | ID  |
|------------------|---------|-------------------------|---------------------|-------------------|------|-----|
| <i>BbrizAG1</i>  | 845 pb  | <i>ZMM2</i>             | <i>Zea mays</i>     | 1e <sup>-86</sup> | 73%  | 82% |
|                  |         | <i>ZAG1</i>             | <i>Zea mays</i>     | 4e <sup>-24</sup> | 58%  | 40% |
|                  |         | <i>OsMADS3</i>          | <i>Oryza sativa</i> | 1e <sup>-90</sup> | 74%  | 85% |
|                  |         | <i>OsMADS58</i>         | <i>Oryza sativa</i> | 3e <sup>-68</sup> | 70%  | 71% |
| <i>BbrizAG2</i>  | 1018 pb | <i>ZMM2</i>             | <i>Zea mays</i>     | 1e <sup>-29</sup> | 59%  | 49% |
|                  |         | <i>OsMADS3</i>          | <i>Oryza sativa</i> | 2e <sup>-32</sup> | 59%  | 50% |
| <i>BbrizSEP2</i> | 1004 pb | <i>ZMM6</i>             | <i>Zea mays</i>     | 1e <sup>-29</sup> | 56%  | 44% |
|                  |         | <i>MADS-Box protein</i> | <i>Oryza sativa</i> | 2e <sup>-23</sup> | 56%  | 38% |
| <i>BbrizSEP</i>  | 363 pb  | <i>MADS-Box protein</i> | <i>Oryza sativa</i> | 4e <sup>-30</sup> | 89%  | 65% |
| <i>BbrizAGL6</i> | 1159 pb | <i>ZAG3</i>             | <i>Zea mays</i>     | 2e <sup>-35</sup> | 55%  | 47% |
|                  |         | <i>ZAG5</i>             | <i>Zea mays</i>     | 1e <sup>-34</sup> | 55%  | 44% |

A sequência deduzida de aminoácidos de *BbrizAG2* (Fig. 7) apresentou inserção da serina (S) no domínio K, troca de serina (S) por alanina (A) no domínio I e de glutamina (Q) por ácido glutâmico (E) no domínio C-terminal. As

diferenças nucleotídicas entre *BbrizAG1* e *BrizAG2* permitem a distinção entre as duas sequências.



**Figura 7.** Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos deduzidas de *BbrizAG1* e *BbrizAG2* de *B. brizantha*, *AG* de *A. thaliana* e os homólogos de *AG* em milho e arroz. As setas indicam a substituição de aminoácidos. A seta pontilhada aponta a substituição. Os domínios *MADS* e *K* estão marcados com as linhas contínua e pontilhada, respectivamente. O domínio *I* está entre os domínios *M* e *K*. O domínio C-terminal situa-se após o domínio *K*. O alinhamento da sequência gerada foi feito utilizando *ClustalW*, acessado pelo programa *Bioedit* versão 7. 0. 9. 0.

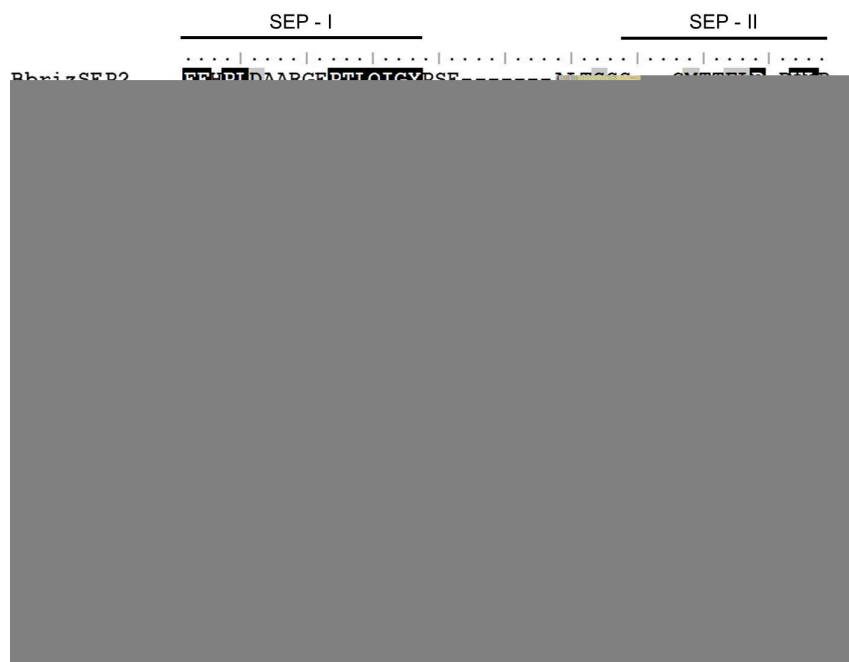
As sequências classificadas como *BbrizAG1* e *BbrizAG2* (Fig. 8), *BbrizSEP2* (Fig. 9), e *BbrizAGL6* (Fig.10), em *B. brizantha* apresentaram os dois motivos típicos de cada proteína no domínio C-terminal. Proteínas do tipo *AGL6* e *SEP* possuem dois motivos conservados no domínio C-terminal localizados em posições similares aos motivos *AG-I* e *AG-II* das proteínas *AG*. Esses domínios são estruturalmente compostos por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e polares e estão envolvidos na ativação transcricional. Em *BbrizAG1* e *BbrizAG2*, o domínio *AG-I* é idêntico ao da proteína *OsMADS3* de

arroz, enquanto que o domínio AG-II corresponde ao de ZMM2 de milho (Fig. 8).



**Figura 8.** Alinhamento da região C-terminal de MADS-box do clado AG-like. Foram utilizadas sequências protéicas de diversas monocotiledôneas, dicotiledôneas e de *Arabidopsis* (Tabela 7). As posições dos dois domínios conservados são indicados acima do alinhamento das sequências. Resíduos de aminoácidos idênticos e similares estão marcados em preto e cinza, respectivamente. O alinhamento da sequência gerada foi feito utilizando ClustalW, acessado pelo programa Bioedit versão 7. 0. 9. 0.

Os domínios SEP-I e SEP-II são menos conservados em relação aos domínios de AG. Algumas gramíneas não apresentam o domínio SEP-II, apenas o domínio SEP-I, devido a uma duplicação recente seguida de uma mudança no quadro de leitura da transcrição do gene no clado *LHS*. BbrizSEP2, entretanto apresenta os dois domínios, SEP-I e SEP-II, semelhante aos domínios identificados em milho na sequência ZmMADS6 e apresenta apenas a adição do resíduo de arginina no domínio SEP-I (Fig.9).



**Figura 9.** Alinhamento da região C-terminal de MADS-box do clado SEP-like. Foram utilizadas seqüências protéicas de diversas monocotiledôneas, dicotiledôneas e de *Arabidopsis* (tabela 8). As posições dos dois domínios conservados são indicadas acima do alinhamento das seqüências. Resíduos de aminoácidos idênticos similares estão marcados em preto e cinza, respectivamente. O alinhamento da seqüência gerada foi feito utilizando ClustalW, acessado pelo programa Bioedit versão 7. 0. 9. 0.

Os domínios AGL6 na porção C-terminal da proteína são mais conservados em comparação às proteínas AG e SEP. O domínio AGL6-I é bem conservado em monocotiledôneas (Fig. 10) e é constituído de 10 resíduos de aminoácidos DCEPTLQIGY. Entretanto, *BbrizAGL6* apresenta uma substituição do ácido glutâmico por ácido aspártico. O segundo domínio, AGL6-II está localizado na porção final do C-terminal e também é composto de 10 aminoácidos, ENNFMLGWVL (Fig. 10).



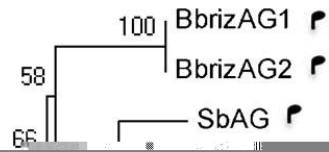
**Figura 10.** Alinhamento da região C-terminal de MADS-box do clado AGL6-like. Foram utilizadas sequências protéicas de diversas monocotiledôneas e de *Arabidopsis* (Tabela 9). Sequência SEP-like de *Arabidopsis* (At SEP1/AGL2) foi inserida no alinhamento para identificação e comparação dos domínios indicados. As posições dos dois domínios conservados são indicadas acima das sequências alinhadas. Resíduos de aminoácidos idênticos similares estão marcados em preto e cinza, respectivamente. O alinhamento da sequência gerada foi feito utilizando ClustalW, acessado pelo programa Bioedit versão 7. 0. 9. 0.

#### 4.2. Análises filogenéticas de genes MADS-box de *B. brizantha*

As sequências completas de resíduos de aminoácidos deduzidos de *B. brizantha* foram alinhadas com sequências do tipo MADS-Box de angiospermas incluindo monocotiledôneas, como *Oryza sativa* e *Zea mays*, e dicotiledôneas e sequências de gimnospermas, utilizando o programa ClustalW, acessado pelo Bioedit versão 7. 0. 9. 0. As árvores filogenéticas resultantes do alinhamento dessas sequências foram construídas utilizando o programa MEGA versão 2.0 (Kumar et al., 2000).

Os resultados obtidos demonstraram que *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2*, e *BbrizAGL6*, estão próximas dos ortólogos de AG, SEP2 e AGL6, de monocotiledôneas, respectivamente, como representado nas figuras 11, 12 e 13. As sequências escolhidas e os respectivos números de acesso utilizados para a construção da árvore filogenética dos clados AG, SEP e AGL6 estão representados nas tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

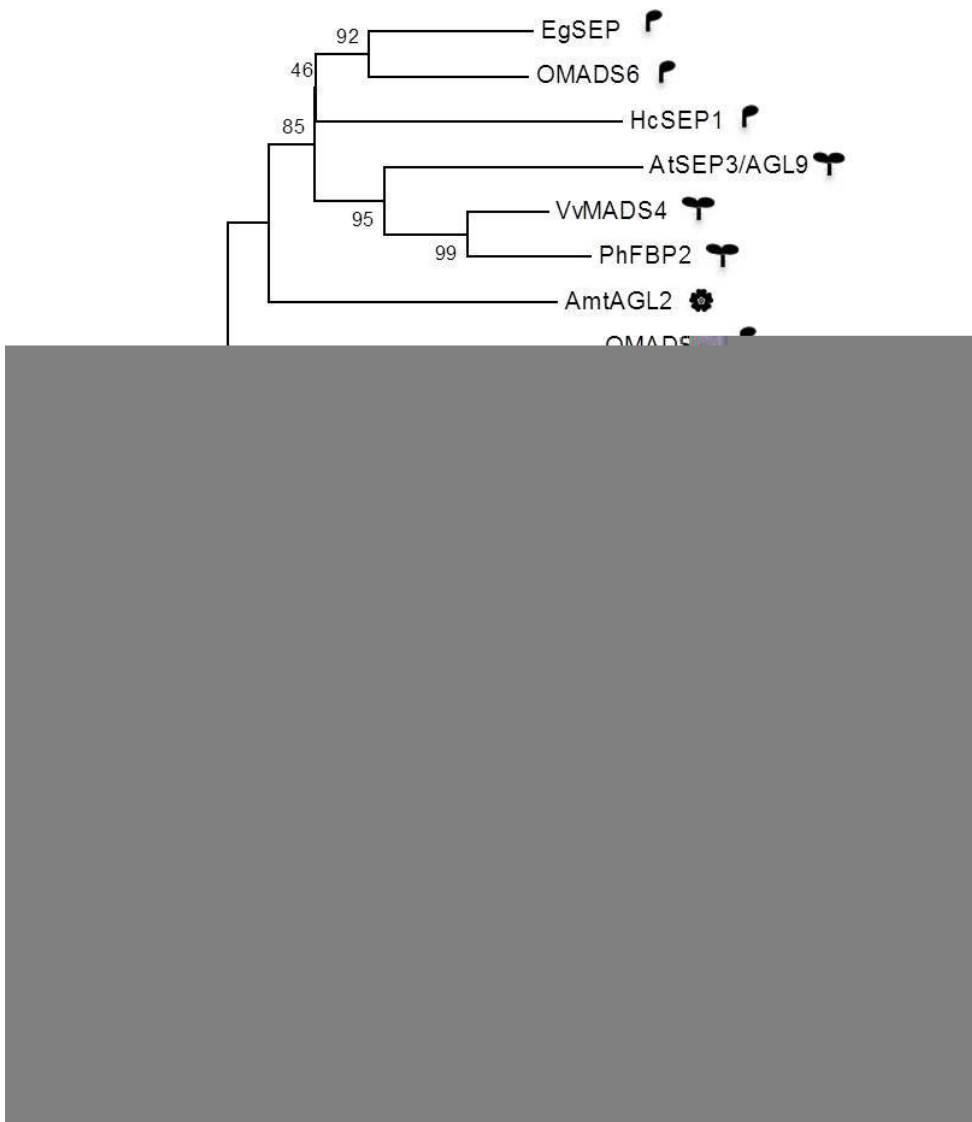








**Figura 11.** Árvore filogenética do clado AG construída pelo método Neighbour-joining de proteínas MADS-box. A descrição de cada sequência está na Tabela 7. Os valores de bootstrap (%) de 1.000 replicatas é apresentado em cada ramo. Apenas os valores maiores que 45% são apresentados. Escala representa número de substituições de aminoácidos por sítio. T P 🌀 🌲 representam dicotiledônea, monocotiledônea, magnoliidae e gimnosperma, respectivamente.

**Tabela 7.** Número de acesso de proteínas selecionadas para a construção da árvore filogenética referente aos genes do clado AG.

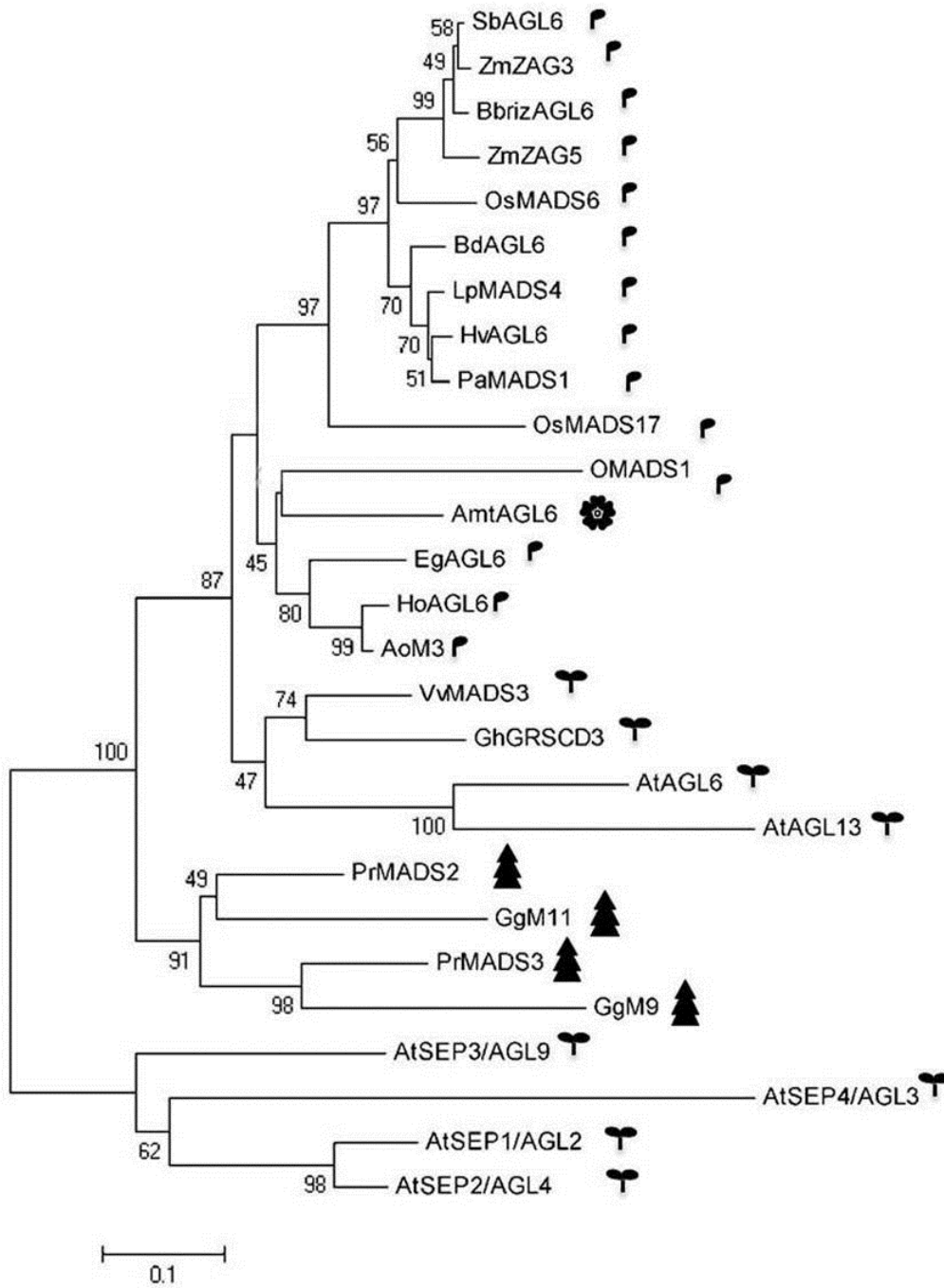
| Proteína | Espécie                               | Número de acesso |
|----------|---------------------------------------|------------------|
| SbAG     | <i>Sorghum bicolor</i>                | XP_002454985.1   |
| ZAG1     | <i>Zea mays</i>                       | NP_001105321.1   |
| OsMADS3  | <i>Oryza sativa</i>                   | Q40704.1         |
| BdMADS3  | <i>Brachypodium distachyon</i>        | XP_003565181.1   |
| ZMM2     | <i>Zea mays</i>                       | CAA57074.1       |
| HvAG1    | <i>Hordeum vulgare</i>                | AF486648_1       |
| HvAG2    | <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> | AF486649_1       |
| OsMADS58 | <i>Oryza sativa</i>                   | Q2V0P1.1         |
| EgAGI    | <i>Elaeis guineensis</i>              | CAE46181.1       |
| FPB6     | <i>Petunia x hybrida</i>              | CAA48635.1       |
| AG       | <i>Arabidopsis thaliana</i>           | P17839.2         |
| PrMADS   | <i>Pinus radiata</i>                  | AAD09342.1       |
| GgM3     | <i>Gnetum gnemon</i>                  | CAB44449.1       |
| PaDAL2   | <i>Picea abies</i>                    | CAA55867.1       |
| CeAG     | <i>Cycas edentata</i>                 | AF492455_1       |
| GbM5     | <i>Ginkgo biloba</i>                  | AAM76208.1       |



**Figura 12.** Árvore filogenética do clado SEP-like construída pelo método Neighbour-joining de proteínas MADS-box. A descrição de cada sequência está na Tabela 8. Os valores de bootstrap (%) de 1.000 replicatas é apresentado em cada ramo. Apenas os valores maiores que 45% são apresentados. Escala representa número de substituições de aminoácidos por sítio     representam dicotiledônea, monocotiledônea, magnoliidae e gimnosperma, respectivamente.

**Tabela 8.** Número de acesso de proteínas selecionadas para a construção da árvore filogenética referente aos genes do clado SEP.

| Proteína    | Espécie                        | Número de acesso |
|-------------|--------------------------------|------------------|
| BdMADS7     | <i>Brachypodium distachyon</i> | XP_003574823.1   |
| ZmMADS6     | <i>Zea mays</i>                | NP_001105153.1   |
| HvMADS9     | <i>Hordeum vulgare subsp.</i>  | CAB97355.1       |
| LpMADS5     | <i>Lolium perenne</i>          | AAO45877.1       |
| EgSEP       | <i>Elaeis guineensis</i>       | AAQ03225.1       |
| VvMADS4     | <i>Vitis vinifera</i>          | XP_002275705.1   |
| AmtAGL2     | <i>Amborella trichopoda</i>    | AAX15917.1       |
| OMADS6      | <i>Oncidium Gower Ramsey</i>   | ADJ67238.1       |
| OMADS11     | <i>Oncidium Gower Ramsey</i>   | ADJ67241.1       |
| OMADS7      | <i>Oncidium Gower Ramsey</i>   | ADJ67239.1       |
| OsMADS7/45  | <i>Oryza sativa</i>            | Q0J466.2         |
| AtSEP1/AGL2 | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | AAA32732.1       |
| AtSEP2/AGL4 | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | NP_186880.1      |
| AtSEP3/AGL9 | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | NP_850953.1      |
| AtSEP4/AGL3 | <i>Arabidopsis thaliana</i>    | NP_178466.1      |
| PhFPB9      | <i>Petunia hybrida</i>         | AAK21249.1       |
| PhFPB2      | <i>Petunia hybrida</i>         | Q03489.2         |
| PhFPB4      | <i>Petunia hybrida</i>         | AAK21247.1       |
| HcSEP2      | <i>Houttuynia cordata</i>      | BAC80254.1       |
| HcSEP1      | <i>Houttuynia cordata</i>      | BAC80253.1       |
| HcSEP3      | <i>Houttuynia cordata</i>      | BAC80255.1       |



**Figura 13.** Árvore filogenética do clado AGL6-like construída pelo método Neighbour-joining de proteínas MADS-box. A descrição de cada sequência está na Tabela 9. Os valores de bootstrap (%) de 1.000 replicatas é apresentado em cada ramo. Apenas os valores maiores que 45% são apresentados. Escala representa número de substituições de aminoácidos por sítio. T P G A representam dicotiledônea, monocotiledônea, magnoliidae e gimnosperma, respectivamente.

**Tabela 9.** Número de acesso de proteínas selecionadas para a construção da árvore filogenética referente aos genes do clado AGL6.

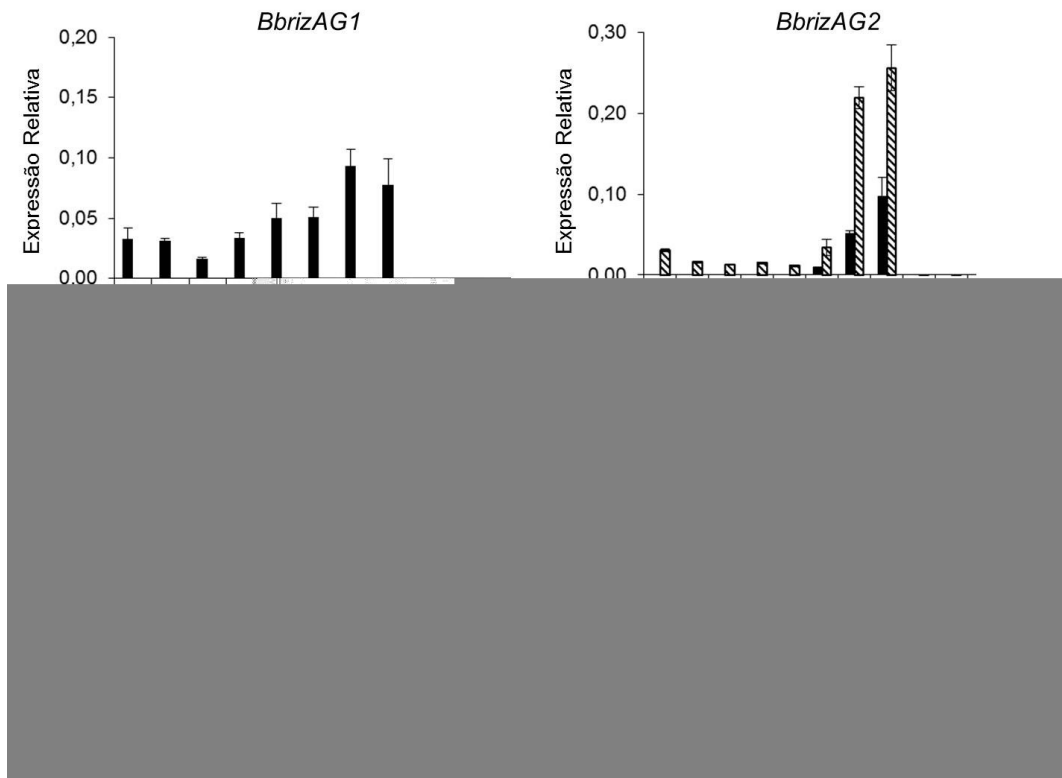
| Proteínas | Espécie                               | Número de acesso |
|-----------|---------------------------------------|------------------|
| SbAGL6    | <i>Sorghum bicolor</i>                | XP_002454472.1   |
| BdAGL6    | <i>Brachypodium distachyon</i>        | ACY71517.1       |
| ZmZAG3    | <i>Zea mays</i>                       | NP_001105332.1   |
| ZmZAG5    | <i>Zea mays</i>                       | NP_001105692.1   |
| HvAGL6    | <i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i> | AAS48128.1       |
| PaMADS1   | <i>Poa annua</i>                      | AAK50865.1       |
| OsMADS6   | <i>Oryza sativa</i>                   | Q6EU39.1         |
| OsMADS17  | <i>Oryza sativa</i>                   | ACX35552.1       |
| LpMADS4   | <i>Lolium perenne</i>                 | AAO45876.1       |
| HoAGL6    | <i>Hyacinthus orientalis</i>          | AAT88088.1       |
| EgAGL6    | <i>Elaeis guineensis</i>              | CAE46187.1       |
| AoM3      | <i>Asparagus officinalis</i>          | AAQ83835.1       |
| OMADS1    | <i>Oncidium Gower Ramsey</i>          | ADJ67237.1       |
| AmtAGL6   | <i>Amborella trichopoda</i>           | AAY25580.1       |
| VvMADS3   | <i>Vitis vinifera</i>                 | XP_002277624.1   |
| GhGRSCD3  | <i>Gerbera hybrid cultivar</i>        | CAH04879.1       |
| AtAGL6    | <i>Arabidopsis thaliana</i>           | NP_182089.1      |
| AtAGL13   | <i>Arabidopsis thaliana</i>           | NP_191671.1      |
| PrMADS2   | <i>Pinus radiata</i>                  | AAD09207.1       |
| PrMADS3   | <i>Pinus radiata</i>                  | AAB58907.1       |
| GgM9      | <i>Gnetum gnemon</i>                  | CAB44455.1       |
| GgM11     | <i>Gnetum gnemon</i>                  | CAB44457.1       |

### 4.3. Perfil de expressão de genes do tipo MADS-box em *B. brizantha*

Análises de expressão de *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6*, foram realizadas por RT-qPCR em órgãos vegetativos (folhas e raízes) e reprodutivos (ovários e anteras em desenvolvimento) das plantas apomítica e sexual (Fig. 14). Todos os transcritos analisados demonstraram especificidade para órgãos reprodutivos como flor, ovário e antera.

O transcrito *BbrizAG1* foi detectado preferencialmente na planta apomítica enquanto *BbrizAG2* foi detectado na planta sexual. A expressão de ambos os transcritos foi maior em anteras nos estádios de desenvolvimento III e IV. A hibridização in situ de anteras ainda não foi realizado devido à dificuldade em incluir anteras maduras em resina BMM. Além disso, o enfoque principal desta tese é o estudo em ovários.

*BbrizSEP2* foi detectado em ovários e anteras de plantas apomítica e sexual. Considerando os ovários, não houve diferença significativa entre as plantas apomítica e sexual. Curiosamente, *BbrizAGL6* apresentou maior expressão em ovários, sendo mais expresso na planta sexual. A expressão de *BbrizAGL6* foi maior em ovários da planta sexual em comparação com a apomítica, principalmente no estágio II, correspondente ao estágio de megasporogênese (Dusi & Willemse, 1999; Araújo et al., 2000b). Não foi observada presença significativa de *BbrizAGL6* em anteras.



**Figura 14.** RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) monitorando a expressão de *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6*. A expressão foi analisada em ovário (OV), antera (ANT) nos estádio iniciais de desenvolvimento (I e II) e no estádio maduro (III e IV) anterior à antese, folha e raiz de plantas apomítica (área em preto) e sexual (área hachurada). Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas.

#### 4.4. Localização temporal e espacial de *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6* em tecidos reprodutivos de *B. brizantha*

Foram realizados três experimentos de hibridização in situ utilizando sonda obtida do gene *BbrizSEP2*. Entretanto, o sinal observado foi sempre fraco. O sinal detectado foi maior em óvulos e anteras da planta sexual (Fig. 15G, K, H, I) em relação à planta apomítica (Fig. 15A, B e C).

Em óvulos, o sinal foi detectado apenas em tecidos esporofíticos, não sendo detectado em saco embrionário de plantas apomítica e sexual. O sinal de hibridização da planta apomítica foi semelhante ao controle negativo no qual foi utilizada uma sonda senso (Fig. 15D, E, F).





**Figura 15.** Detecção dos transcritos *BbrizSEP2* por hibridização in situ em cortes semi-finos. Foram utilizadas para análise anteras (A, K) e ovários (A, B, C, G, H, I) de *B. brizantha* apomítica (A, B, C) e sexual (G, H, I). Hibridização da sonda senso em ovário (D, E, F) e antera (D) de *B. brizantha* apomítica e de ovário (L, M, N) e antera (L) de *B. brizantha* sexual. AP = antípodas; NP = núcleo polar; O = oosfera; PMC = célula-mãe do micrósporo; SY = sinérgide; TP = células do tapete. Barra = 20  $\mu$ m.

Os resultados de RT-qPCR apontaram que, entre os genes estudados neste trabalho, *BbrizAGL6* foi o principal candidato ao envolvimento com apomixia, pois apresentou maior expressão no ovário em comparação aos demais órgãos. Além disso, *BbrizAGL6* apresentou modulação da sua expressão entre ovários de plantas apomítica e sexual. O ovário é o órgão floral onde é detectada a apomixia. A expressão diferencial entre plantas apomíticas e sexuais em ovários sugerem um papel desse gene na definição do modo de reprodução por semente. Investigação temporal e espacial da expressão de *BbrizAGL6* em ovários e anteras de *B. brizantha* apomítica e sexual foi realizada por hibridização in situ (Fig. 16).

Durante a microsporogênese o sinal de *BbrizAGL6* foi maior na célula-mãe do grão de pólen (PMC) em comparação às células do tapete de anteras tanto de plantas apomítica quanto sexual. Em ovários, *BbrizAGL6* foi localizado na MMC de plantas apomítica e sexual. Na planta apomítica, a expressão de *BbrizAGL6* também foi detectada nas células do nucelo que circundam a MMC. Durante a megagametogênese, a expressão de *BbrizAGL6* diminui em ovários de plantas apomítica e sexual, não sendo detectado no saco embrionário durante a sua formação. A sonda senso de *BbrizAGL6* foi utilizada como controle e nenhum sinal de hibridização foi detectado, como esperado (Fig. 16I, 16J).



**Figura 16.** Detecção dos transcritos de *BbrizAGL6* por hibridização in situ em cortes semi-finos. Foram utilizados anteras (A, D) e ovários (B, E, G, H) de *B. brizantha* apomítica (A, B, G) e sexual (D, E, H). Representação esquemática do resultado de hibridização in situ em megasporogênese de plantas apomítica (C) e sexual (F). Hibridização da sonda senso em ovário (I) e antera (J) de *B. brizantha* apomítica. EA, aparato da oosfera; MMC, célula-mãe do megásporo; N, nucelo; PMC, célula-mãe do micrósporo; TP, tapete. Barra = 20  $\mu$ m.

#### **4.5. Análise de interação proteína-proteína com os componentes dos complexos multiméricos responsáveis pela identidade do carpelo e do óvulo**

Interações entre as proteínas MADS-box são essenciais para o correto funcionamento dessas proteínas e para o controle dos processos biológicos. Vem sendo demonstrado que essas interações são conservadas em monocotiledôneas e dicotiledôneas (Favaro et al., 2002; Folter & Angenent,

2006). Os fatores de transcrição do tipo MADS-box foram extensivamente estudados em diversos heterodímeros (de Folter et al., 2005).

Experimentos de duplo híbrido em levedura foram realizados entre BbrizAGL6, BbrizAG1, BbrizAG2 e BbrizSEP2 e proteínas MADS-box de *Arabidopsis* envolvidas na formação dos complexos multiméricos que determinam identidade do carpelo e do óvulo para investigar se as sequências de *B. brizantha* também são capazes de interagir (Tabela 10). AGAMOUS (AG), SHP1 e SHP2, membros da classe C; STK, da classe D e a versão truncada de SEP3 $\Delta$ 192 da classe E foram utilizados no teste de duplo híbrido. Foi utilizada somente a versão deletada de SEP3 no aminoácido na posição 192, pois a proteína completa autoativa o gene repórter (Brambilla et al., 2007).

Os ensaios de duplo híbrido demonstraram que BbrizAGL6 homodimeriza e heterodimeriza com AG, SHP1, SHP2 e STK e com BbrizAG1, BbrizAG2 e BbrizSEP2 de *B. brizantha* (Tabela 10). BbrizAGL6, entretanto, interage com SHP1, SHP2 e STK somente quando a sequência codificadora de *BbrizAGL6* é fusionada ao domínio de ativação AD e SHP1, SHP2 e STK, fusionados ao domínio de ligação BD e quando as interações foram analisadas em placas contendo meio seletivo sem triptofano, leucina e adenina (-WLA). BbrizSEP2 interagiu com todas as sequências analisadas de *Arabidopsis* e de *B. brizantha*, porém não formou homodímeros (Tabela 10). BbrizAG1 e BbrizAG2 somente não interagiram com genes do clado C como AG, SHP1 e SHP2 e também não formaram homodímeros (Tabela 10). As proteínas testadas não interagiram com os vetores AD e BD vazios, quando a levedura foi transformada e mantida em meio de crescimento na ausência de triptofano (Trp), leucina (Leu) e histidina (His) e suplementado com 3-aminotriazol na concentração [5 mM]. Autoativação foi observada somente quando as sequências de *B. brizantha* foram clonadas no vetor BD e analisadas em meio seletivo -WLA.

**Tabela 10.** Ensaios de duplo híbrido de MADS-Box de *A. thaliana* e de *B. brizantha*.

| GAL4-AD   | GAL4-BD       |              |              |               |      |    |          |     |      |      |
|-----------|---------------|--------------|--------------|---------------|------|----|----------|-----|------|------|
|           | Bbriz<br>AGL6 | Bbriz<br>AG1 | Bbriz<br>AG2 | Bbriz<br>SEP2 | AGL6 | AG | SEP3Δ192 | STK | SHP1 | SHP2 |
| AGL6      | +             | +            | +            | +             | +    |    |          |     |      |      |
| AG        | +             | -            | -            | +             |      |    |          |     |      |      |
| SEP3Δ192  | +             | +            | +            | +             |      |    |          |     |      |      |
| STK       | -             | -            | -            | -             |      |    |          |     |      |      |
| SHP1      | -             | -            | -            | -             |      |    |          |     |      |      |
| SHP2      | -             | -            | -            | -             |      |    |          |     |      |      |
| BbrizA6   | +             | +            | +            | +             | +    | +  | +        | +   | +    | +    |
| BbrizAG1  | +             | -            | -            | +             | +    | -  | +        | +   | -    | -    |
| BbrizAG2  | +             | -            | -            | +             | +    | -  | +        | +   | -    | -    |
| BbrizSEP2 | +             | +            | +            | -             | +    | +  | +        | +   |      | +    |

+, crescimento em meio seletivo. -, ausência de crescimento em meio seletivo.

#### 4.6. Expressão de *BbrizAGL6* e *AGL6* em *Arabidopsis* sob controle dos promotores STK e WM

O gene *AGL6* foi um dos primeiros a ser investigado na família MADS-box, porém pouco se sabe a respeito desse gene devido à ausência de fenótipo evidente no mutante *agl6* de *Arabidopsis* (Ma et al., 1991; Rounsley et al., 1995; Becker & Theissen, 2003; Schauer et al., 2009; Koo et al., 2010). Em arroz, o silenciamento e a redução transcricional de *OsMADS6*, causam alterações severas na identidade do órgão floral (Zhang et al., 2010). Expressão constitutiva de *AGL6* e a expressão ectópica de *AGL6* de orquídea e hiacinto em *Arabidopsis* somente causa florescimento precoce (Hsu et al., 2003; Fan et al., 2007; Koo et al., 2010). Considerando o padrão de expressão de *BbrizAGL6* em *Brachiaria* e o padrão de *AGL6* nas demais angiospermas, é possível elaborar a hipótese de que a regulação transcricional de *AGL6* possui um papel importante na formação do saco embrionário.

Em *Arabidopsis*, o fato de o mutante *agl6* não apresentar fenótipo evidente pode ser apenas uma limitação na detecção de pequenas mudanças fenotípicas ou o resultado de uma recente duplicação de genes parálogos, que gera baixa frequência de fenótipo (Zhang, 2003). Genes com função redundante são bastante observados em famílias gênicas que incluem diversos genes com funções semelhantes e são frequentemente encontrados entre os

fatores de transcrição. Em muitos casos para se obter um fenótipo evidente é necessária a produção de múltiplos mutantes (Riechmann et al., 2000).

Uma ferramenta alternativa da genética reversa é a super-expressão de genes em transgênicos para estudar fatores de transcrição. Entretanto, a super-expressão constitutiva de *AGL6* e de *AGL6* associado ao repressor transcricional gerou apenas florescimento precoce, não afetando o desenvolvimento dos óvulos e da semente (Schauer et al., 2009). Considerando o estudo em óvulos, o uso do promotor 35S não tem se demonstrado muito eficiente, ou seja, a expressão não é detectada em todo o óvulo, sendo restrita aos estigmas (Wilkinson et al., 1997).

O uso de promotores constitutivos para a super-expressão pode acarretar diversos problemas no crescimento da planta e causar fenótipos de difícil interpretação. Uma forma de contornar este problema é a utilização de promotores tecido-específicos, ou quimicamente induzidos, conforme revisão de (Zhang, 2003).

Para estudar os efeitos da expressão ectópica de *AGL6* no desenvolvimento do saco embrionário, plantas transgênicas de *Arabidopsis* foram obtidas contendo a região codificadora de *AGL6* ou de *BbrizAGL6* fusionada aos promotores dos genes *SEEDSTICK* de *A. thaliana* (pSTK) e WM403 de *Citrullus lanatus* (pWM). pSTK é um promotor óvulo específico que direciona a transcrição somente para o tecido placentar e para os óvulos em desenvolvimento (Kooiker et al., 2005). pWM foi recentemente descrito como específico da região nucelar de óvulos de *Arabidopsis* durante a megasporogênese. A expressão de *GUS* dirigida pelo promotor de WM é restrita ao nucelo e saco embrionário nos estádios iniciais de desenvolvimento até a formação do embrião no estágio globular (Dwivedi et al., 2010).

As plantas transgênicas obtidas foram caracterizadas e a presença de T-DNA, com pSTK::*BbrizAGL6* ou pSTK::*AGL6*, foi confirmada por PCR. Transformantes apresentaram alta porcentagem de aborto de óvulos em comparação à planta selvagem (Fig. 17A, B e C). No total, a presença de T-DNA foi confirmada em 19 de 36 plantas transgênicas da geração T1 contendo o transgene pSTK::*BbrizAGL6* e em 15 de 20 plantas contendo o transgene pSTK::*AGL6*.

Todas as plantas, que continham o transgene, se desenvolveram normalmente durante a fase vegetativa, entretanto uma planta entre as 19 e três plantas entre as 15 da geração T1 contendo os transgenes pSTK::*BbrizAGL6* e pSTK::*AGL6*, respectivamente, apresentaram alta porcentagem de aborto de óvulos, em uma média de cinco sílicas analisadas por planta. Não foi observado aborto de semente nessas plantas indicando que os transgenes pSTK::*BbrizAGL6* e pSTK::*AGL6* afetam o desenvolvimento do óvulo antes da fertilização.

Na geração T1 de plantas contendo o transgene pSTK::*BbrizAGL6*, que apresentaram aborto de óvulos, 76 de 171 (44%) óvulos analisados foram abortados antes de ocorrer fertilização. A co-segregação de tal fenótipo foi confirmada nas gerações seguintes T2 e T3. Sementes de T1 foram coletadas e em seguida plantadas para obter a geração T2, que apresentou uma média de 40 óvulos abortados em 133 óvulos estudados (30%). A geração T3, proveniente das sementes coletadas de T2, mostraram 168 abortos de óvulos em um total 520 (32%). No total, as plantas contendo o transgene pSTK::*BbrizAGL6* apresentaram uma média de 284 óvulos abortados em um total de 824 analisados (34%) (Tabela 11).

Entre as 15 plantas de *Arabidopsis*, que continham o transgene pSTK::*AGL6* na geração T1, três plantas apresentaram uma média de 227 óvulos abortados em um total de 408 (56%). As progênes T2 de duas plantas T1 mostraram uma média de 188 abortos de óvulos em um total de 391 (48%).

No total, as plantas que continham o transgene pSTK::*AGL6* revelaram uma média de 415 óvulos abortados de um total de 799 (52%) (Tabela 11). Maior porcentagem de aborto de óvulos nessas plantas em comparação às

plantas que possuem o transgene pSTK::*BbrizAGL6* pode ser consequência das diferenças de nucleotídeos entre as sequências gênicas de *BbrizAGL6* e *AGL6*.

Análises morfológicas foram realizadas para determinar em qual estágio de desenvolvimento o aborto de óvulos era observado. Considerando as plantas que continham os transgenes pSTK::*BbrizAGL6* e pSTK::*AGL6* e que apresentaram aborto de óvulos, o desenvolvimento dos óvulos apresentava-se normal até o estágio de formação do saco embrionário com um núcleo. Quando as sílicas de plantas transgênicas apresentavam óvulos no estágio de desenvolvimento FG5 (Schneitz et al., 1995), alguns óvulos não apresentavam o desenvolvimento normal, tendo o seu desenvolvimento bloqueado no estágio FG1 em comparação a um óvulo de planta selvagem (Schneitz et al., 1995) (Fig. 17D, E, F).



**Tabela 11.** Número de óvulos abortados em plantas contendo os transgenes pSTK::*BbrizAGL6* ou pSTK::*AGL6*. Como controle foram utilizadas plantas que apresentavam a presença dos transgenes, mas não apresentavam fenótipo.

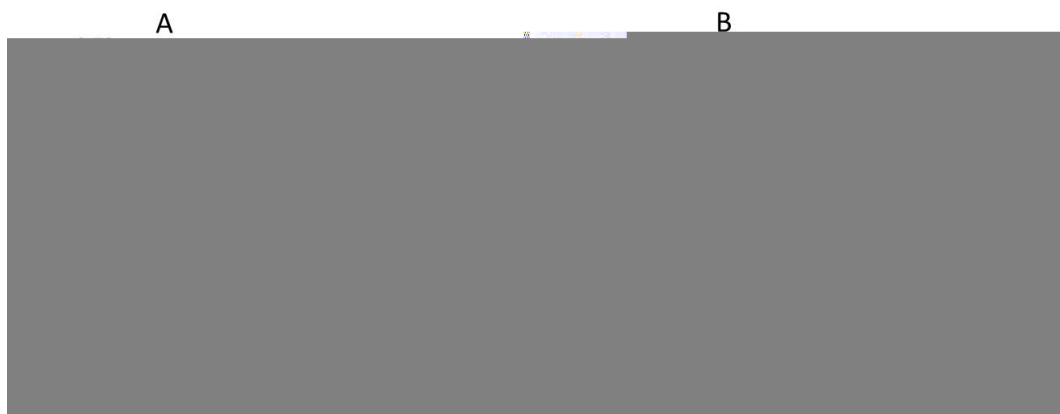
|                         | Geração | Plantas | OvAb | TOT | AO % | AOG % |
|-------------------------|---------|---------|------|-----|------|-------|
| pSTK:: <i>BbrizAGL6</i> | T1      | P.6     | 76   | 171 | 44%  | 44%   |
|                         | T2      | P.6.1   | 40   | 133 | 30%  | 30%   |
|                         | T3      | P.6.1.1 | 33   | 128 | 26%  |       |
|                         | T3      | P.6.1.3 | 31   | 97  | 32%  |       |
|                         | T3      | P.6.1.4 | 38   | 93  | 41%  | 32%   |
|                         | T3      | P.6.1.5 | 29   | 95  | 30%  |       |
|                         | T3      | P.6.1.7 | 37   | 107 | 35%  |       |
| <b>Total</b>            |         |         | 284  | 824 |      | 34%   |
| pSTK:: <i>AGL6</i>      | T1      | P.2     | 94   | 142 | 66%  |       |
|                         | T1      | P.12    | 44   | 149 | 29%  | 56%   |
|                         | T1      | P.19    | 89   | 117 | 76%  |       |
|                         | T2      | P.2.3   | 46   | 118 | 39%  |       |
|                         | T2      | P.19.1  | 43   | 105 | 41%  | 48%   |
|                         | T2      | P.19.2  | 99   | 168 | 59%  |       |
| <b>Total</b>            |         |         | 415  | 799 |      | 52%   |
| Controle                |         | 1       | 0    | 180 | 0%   |       |
|                         |         | 2       | 1    | 202 | 2,2% |       |
|                         |         | 3       | 1    | 225 | 2,2% |       |
|                         |         | 4       | 0    | 160 | 0%   |       |

OvAb: número de óvulos abortados por planta; AO%: porcentagem aborto de óvulos por planta; TOT: número total de óvulos por planta; AOG% : porcentagem de aborto de óvulos por geração. T1: planta transgênica; F1: progênie das plantas T1 e F2 é a progênie das plantas F1. Uma média de cinco sílicas para cada planta foi analisada.



**Figura 17.** Sílicas e ovários de *A. thaliana* selvagem e contendo os transgenes *pSTK::BbrizAGL6* e *pSTK::AGL6*. Em A sílica cheia de *A. thaliana* selvagem. Em B e C sílicas de plantas transformadas com os transgenes *pSTK::BbrizAGL6* e *pSTK::AGL6*, respectivamente. Pontas das setas indicam aborto de óvulos. Em D, óvulo de *A. thaliana* selvagem clareado no estágio FG5 com os oito núcleos aparentes (três antípodas coloridas em rosa, dois núcleos polares em azul, duas sinérgides em verde e uma oosfera em amarelo). Em E e F, óvulos clareados das plantas transformadas com os transgenes *pSTK::BbrizAGL6* e *pSTK::AGL6*, respectivamente, no estágio correspondente a FG5 com apenas um núcleo, indicado pelas setas. En: endotélio. Em A, B e C, barra = 1.25 mm. Em D, E e F, barra = 20µm

Expressão de *BbrizAGL6* e *AGL6* foi detectada por RT-qPCR nas plantas T1 e T2 que continham o transgene *pSTK::BbrizAGL6* e apresentaram o fenótipo de óvulos abortados. Amostras da planta selvagem (WT) e da planta T1, p.11, que não apresentou fenótipo de aborto de óvulos, foram usadas como controle (Fig. 18A). Expressão endógena de *AGL6* não foi alterada nas plantas *pSTK::BbrizAGL6* das gerações T1 (P.6 e P.11) e T2 (P. 6.1) (Fig. 18A). Planta P.19 que contém o transgene *pSTK::AGL6* apresentou super-expressão de *AGL6* em comparação ao esperado na planta selvagem (WT) e na planta T1 (P.15) que apresentava a presença do transgene mas não apresentava fenótipo (Fig. 18B).

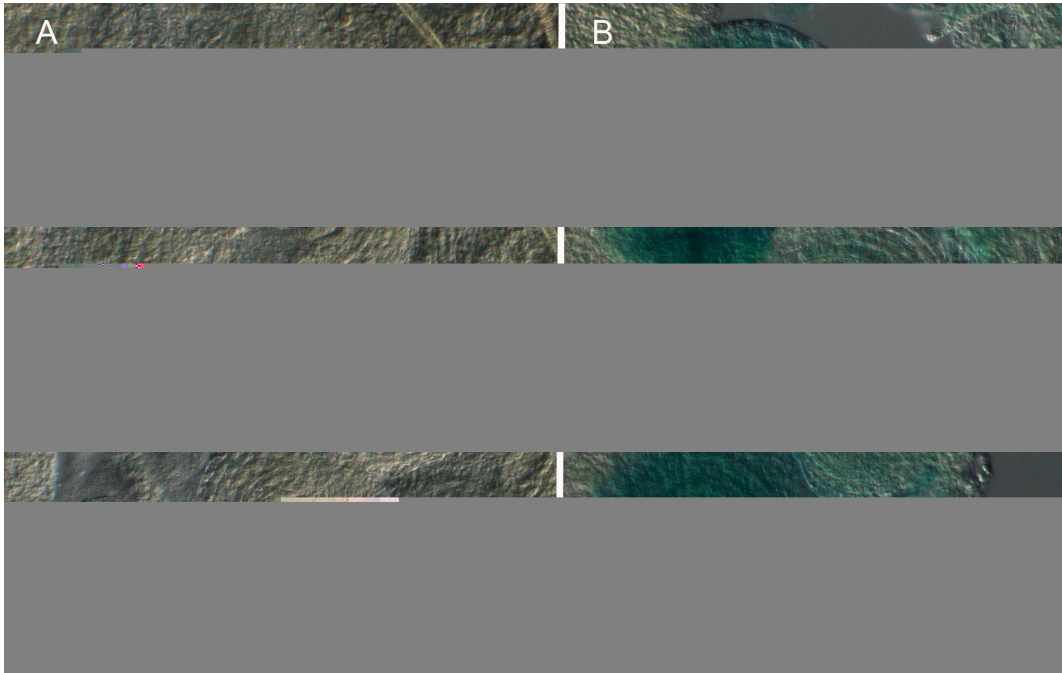


**Figura 18.** PCR em tempo real (RT-qPCR) monitorando a expressão de *BbrizAGL6* e de *AGL6* em plantas transgênicas. Barras em preto e em cinza indicam expressão relativa de *BbrizAGL6* e de *AGL6*, respectivamente, em plantas transgênicas contendo os transgenes pSTK::*BbrizAGL6*.(A) e pSTK::*AGL6*. (B). Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas.

Para avaliar o papel de *BbrizAGL6* e *AGL6* no nucelo de óvulos de *Arabidopsis* (planta com reprodução sexual), a região promotora do gene *WM403* de *Citrullus lanatus* (número de acesso AF008925) foi clonada neste trabalho a partir de DNA genômico de folha de *Citrullus lanatus* de acordo com (Dwivedi et al., 2010) e fusionada ao gene *GUS*.

Análises feitas na região promotora do gene *WM403* evidenciaram elementos restritos à expressão em sementes, endosperma e embrião e associados ao sinal de transdução de sinal regulados pela luz. Além disso, foi encontrado um elemento que dirige a expressão no óvulo e é essencial para aumentar a expressão em regiões específicas (Dwivedi et al., 2010).

Entretanto, curiosamente, o padrão de expressão de *GUS* não foi encontrado no nucelo, antes da fertilização, em carpelos de flores ainda fechadas (Fig. 19A). Nesta mesma planta, em flores abertas, a expressão de *GUS* foi observada em todo o óvulo, apenas após fertilização (Fig 19B). Não foi encontrada expressão de *GUS* nos demais tecidos reprodutivos do óvulo e em tecido vegetativo. Não foram feitas análises do padrão de expressão de *GUS* direcionado pelo p*WM* durante a maturação das sementes de *Arabidopsis*. As plantas que continham o p*WM* fusionado ao gene *GUS* apresentaram desenvolvimento normal e ausência de aborto de óvulos e sementes.



**Figura 19.** Padrão de expressão do promotor pWM em *A. thaliana*. Óvulos de *A. thaliana* em megasporogênese (A) e após fertilização (B) mostrando expressão de *GUS* dirigida sob o controle do promotor pWM em todo o óvulo somente após a fertilização. Barra = 20um.

Apesar de pWM não ter sido demonstrado como específico de nucelo, *BbrizAGL6* e *AGL6* foram fusionados a esse promotor e introduzidos em *Arabidopsis* por meio de *Agrobacterium tumefaciens*. As plantas transgênicas obtidas apresentavam o crescimento vegetativo normal, porém, as sílicas, quando maduras, demonstravam aborto de sementes além do esperado (Tabela 12).

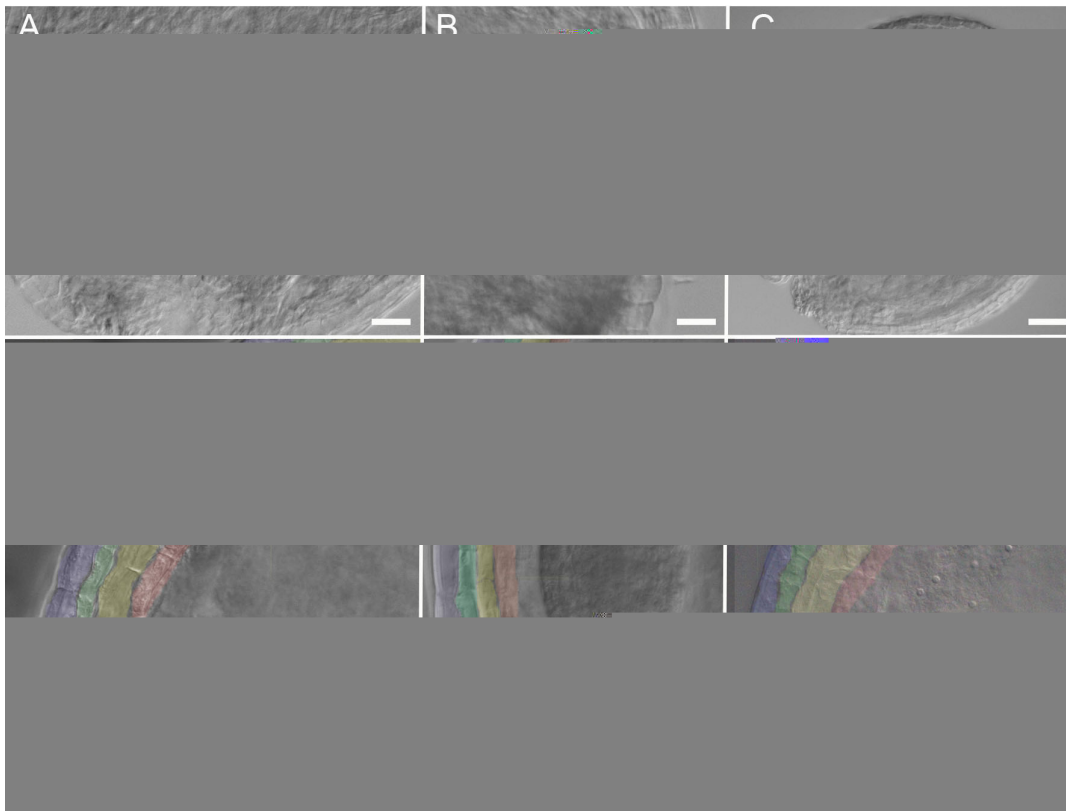
A presença do transgene pWM::*BbrizAGL6* foi detectada por PCR em 20 plantas. Dessas plantas, seis apresentaram 200 sementes abortadas em um total de 904 sementes analisadas (22,1%). Considerando as 19 plantas que apresentaram o transgene pWM::*AGL6*, sete exibiram 140 sementes abortadas em um total de 850 sementes analisadas (16,5%). A expressão gênica preferencialmente para óvulos após a fertilização talvez seja o motivo pelo qual não tenha sido observado aborto de óvulos com a utilização de pWM. Não foram feitas ainda análises de RT-qPCR para confirmar a expressão do transgene nas plantas que apresentaram fenótipo de aborto de sementes.

**Tabela 12.** Número de sementes abortadas em plantas contendo os transgenes *pWM::BbrizAGL6* ou *pWM::AGL6*. Como controle, foram utilizadas plantas que apresentavam a presença dos transgenes, mas não apresentavam fenótipo.

|                       | Plantas | SAb | TOT | AO %   |
|-----------------------|---------|-----|-----|--------|
| <i>pWM::BbrizAGL6</i> | 1       | 37  | 165 | 22,4%  |
|                       | 2       | 28  | 237 | 11,8%  |
|                       | 3       | 42  | 129 | 32,6%  |
|                       | 4       | 24  | 111 | 21,6%  |
|                       | 5       | 12  | 106 | 11,32% |
|                       | 6       | 57  | 156 | 36,5%  |
| <b>Total</b>          |         | 200 | 904 | 22,1%  |
| <i>pWM::AGL6</i>      | 1       | 15  | 123 | 12,2%  |
|                       | 2       | 23  | 105 | 22%    |
|                       | 3       | 15  | 136 | 11%    |
|                       | 4       | 28  | 136 | 25,7%  |
|                       | 5       | 18  | 109 | 16,5%  |
|                       | 6       | 28  | 154 | 18,2%  |
|                       | 7       | 13  | 87  | 15%    |
| <b>Total</b>          |         | 140 | 850 | 16,50% |
| Controle              | 1       | 0   | 107 | 0%     |
|                       | 2       | 0   | 165 | 0%     |
|                       | 3       | 0   | 179 | 0%     |
|                       | 4       | 0   | 121 | 0%     |

Análises morfológicas das sementes em desenvolvimento demonstraram defeitos no desenvolvimento do embrião e alteração na formação dos tegumentos. O embrião se desenvolveu somente até a fase de torpedão em plantas contendo os transgenes *pWM::BbrizAGL6* (Fig. 20A) e *pWM::AGL6* (Fig. 20B). A planta selvagem apresentou desenvolvimento completo do embrião (Fig. 20C).

As cinco camadas da semente transgênica, derivadas dos tegumentos do óvulo, apresentaram-se ligeiramente mais alongada tanto nas plantas com *pWM::BbrizAGL6* (Fig. 20D) quanto em plantas com *pWM::AGL6* (Fig. 20E) em comparação à semente de *Arabidopsis* selvagem (Fig. 20F).



**Figura 20.** Sementes de *A. thaliana* em desenvolvimento, após clareamento. Sementes de plantas contendo os transgenes *pWM::BbrizAGL6* (A e D), *pWM::AGL6* (B e E) mostrando desenvolvimento do embrião (A e B) somente até a fase torpedão e formação das camadas da semente com células alongadas (D e E) em comparação à planta selvagem (F). C representa a formação do embrião na planta selvagem. As cinco camadas que compõem a semente são representadas em cores. Barra = 20  $\mu$ m

## 5. Discussão

O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na reprodução por sementes de angiospermas, sexual ou por apomixia, desde a formação dos órgãos florais à geração de sementes viáveis ainda é elusivo, uma vez que a localização e número de órgãos reprodutivos na maioria das plantas restringe sua análise. Genes do tipo MADS-box, conservados nos diferentes reinos de organismos, são amplamente estudados em plantas contribuindo para o esclarecimento de aspectos relacionados à formação do órgão floral (Purugganan et al., 1995). *AGL6*, *SEP2* e *AG* pertencem ao grupo MIKC<sup>c</sup> dos genes do tipo MADS-box. Geralmente, genes desse grupo são expressos exclusivamente em tecidos diplóides que controlam diversos aspectos do desenvolvimento do esporófito como desenvolvimento de sépalas, pétalas, carpelo e estames; determinação do florescimento e do meristema floral; formação do fruto. Eles estão envolvidos em quase todos os níveis da via regulatória do desenvolvimento reprodutivo na fase esporofítica e indiretamente na fase gametofítica (Gramzow & Theissen, 2010).

Nesta tese, foi verificado em *B. brizantha* que genes identificados como do tipo MADS-box quanto à sequência protéica deduzida, ao padrão de expressão e à interação protéica, *BbrizAG1* e *BbrizAG2*, *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6*, podem apresentar participação no desenvolvimento do carpelo e antera de plantas apomíticas e sexuais.

Em *B. brizantha*, a classificação dos genes *AG* foi ratificada pela presença de dois domínios (I e II), característicos desse gene, constituídos principalmente por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e polares em sua região C-terminal. Os clones obtidos em *B. brizantha* que apresentaram similaridade com *AG* foram classificados em *BbrizAG1* e *BbrizAG2* devido às diferenças em sequências de nucleotídeos encontradas que causaram uma adição e duas substituições de aminoácidos em *BbrizAG2*. As substituições de aminoácidos ocorrem especificamente entre os dois motivos destacados na região C-terminal relacionada com a formação de complexos multimérico e também no domínio I que especifica a formação de dímeros (Egea-Cortines et al., 1999; Honma & Goto, 2001). A região C-terminal de proteínas do tipo

MADS-box com atividade de ativação transcricional é rica em resíduos ácidos e em glutaminas (Cho et al., 1999). Portanto, a substituição neste domínio de um resíduo de glutamina, por ácido glutâmico em *BbrizAG2* não deve alterar a atividade desse domínio. A adição de resíduo de serina no domínio K de *BbrizAG2* também foi observada em *OsMADS3*, homólogo de *AG* em arroz.

Em monocotiledôneas, antes da divergência entre milho e arroz, ocorreu uma duplicação do gene *AG* e conseqüente subfuncionalização desse gene (Irish, 2003; Kramer et al., 2004). Em arroz e milho, o papel de *AG* é orquestrado por dois genes. Em milho, *ZAG1* é responsável pela determinação do destino dos órgãos florais enquanto *ZMM2* está envolvido com o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (Schmidt et al., 1993; Mena et al., 1996). Em arroz, *OsMADS58* atua na determinação do destino dos primórdios dos órgãos no meristema floral e na morfogênese do carpelo e participa em menor escala na determinação do órgão reprodutivo masculino. *OsMADS3*, entretanto, está envolvido principalmente com a especificação dos estames e está fracamente relacionado com a determinação do meristema floral (Koyozuka & Shimamoto, 2002; Yamaguchi et al., 2006).

Nas demais plantas, *AG* está envolvido na manutenção do destino do estame e do carpelo e na diferenciação dos órgãos primordiais (Bowman et al., 1991). Esse gene está indiretamente envolvido na esporogênese por meio da regulação do *SPOROCTELESS* (Toshiro et al., 2004), na maturação dos estames, controlando a biossíntese do fitohormônio ácido jasmônico (Ito et al., 2007) e também na diferenciação e no padrão dos órgãos reprodutivos por meio da regulação epigenética de *GIANT KILLER* (Ng et al., 2009).

Os genes isolados em *B. brizantha* que apresentaram homologia com *AG* exibem um padrão de expressão semelhante a *OsMADS3* e *ZMM2*. Considerando os resultados de RT-qPCR, em *B. brizantha*, *BbrizAG1* e *BbrizAG2* também podem estar envolvidos na formação da antera e nos eventos de microsporogênese. Experimentos de RT-qPCR indicaram forte presença de *BbrizAG1* em anteras da planta apomítica nos estádios finais de desenvolvimento, enquanto que o mesmo foi observado com *BbrizAG2* na planta sexual. Apesar de *BbrizAG1* e *BbrizAG2* serem encontrados em plantas



apomíticas e sexuais, existe uma preferência na expressão de cada gene em determinado tipo de planta.

O perfil de expressão de *BbrizAG1* e *BbrizAG2* preferencialmente em anteras e a semelhança na sequência protéica de *BbrizAG1* e *BbrizAG2* com *ZZM2* e *ZAG3* levam a crer que, como em arroz e em milho, em braquiária, também pode ter havido a subfuncionalização desse gene. A subfuncionalização pode ser consequência, dentre outros fatores, da aloploidização (Adams et al., 2003), como sugerido para a origem de *B. brizantha* apomítica (Nielen et al., 2010). O evento de aloploidização de *B. brizantha* poderia explicar também a expressão preferencial de *BbrizAG1* na planta apomítica e de *BbrizAG2* na planta sexual. Essas duas sequências podem representar alelos diferentes.

Em *A. thaliana*, assim como em arroz, AG (*OsMADS3*, em arroz) não é capaz de formar heterodímero com STK (*OsMADS13* em arroz) (Favaro et al., 2003; Li et al., 2011b). STK, SHP1 e SHP2 pertencem ao mesmo clado de AG e são redundantes na determinação da identidade do óvulo em *A. thaliana*. Esses genes das classes C/D de MADS-Box apresentaram diversos processos evolutivos como sub-funcionalização e neo-funcionalização. Alguns desses eventos ocorreram após a diferenciação de dicotiledôneas e monocotiledôneas gerando diferentes funções (Scutt et al., 2006).

Em *A. thaliana* o clado C/D é suficiente para determinar a identidade do carpelo, enquanto que arroz requer ainda a ação do gene homeótico *DROOPING LEAF (DL)* da família YABBY (Scutt et al., 2006; Li et al., 2011b). Entretanto na presença de *SEP3*, em *A. thaliana*, STK forma complexo multimérico com AG (Favaro et al., 2003). Em *B. brizantha*, no entanto, foi observada interação entre STK e *BbrizAG*, entretanto não foi possível observar interação de *BbrizAG* com SHP. A não interação de SHP com *BbrizAG*, assim como a não interação de AG com *BbrizAG* e não formação de homodímeros de *BbrizAG* corroboram o fato de genes do clado C não serem capazes de formar homodímeros tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas (Favaro et al., 2002; Favaro et al., 2003).

As diferenças nas sequências protéicas de *BbrizAG1* e *BbrizAG2* não interferiram nas interações protéicas feitas nos ensaios de duplo híbrido,

provavelmente devido à presença de domínio K idêntico tanto em BbrizAG1 quanto em BbrizAG2. O domínio K constitui o principal domínio envolvido na dimerização (Yang, 2004). As diferenças de aminoácidos localizadas nos domínios I e C podem, por sua vez, interferir na formação dos complexos multiméricos (Davies & Schwarz-Sommer, 1994). Em *Brachiaria*, ensaios de triplo híbrido devem ainda ser realizados para verificar se há diferença na formação dos complexos multiméricos com BbrizAG1 e BbrizAG2.

BbrizSEP2 apresenta os domínios característicos de proteínas SEPALLATA, SEP-I e SEP-II, na região terminal e é agrupada na árvore filogenética juntamente com as demais proteínas do tipo SEP de monocotiledôneas. A adição da arginina no domínio SEP-I ocorre em uma região menos conservada, a qual apresenta grande variação entre as diferentes espécies de plantas incluindo as monocotiledôneas, como observado nos alinhamentos realizados. Em *Arabidopsis*, SEP1 e SEP2 apresentam sequências proteicas muito similares e função redundante (Pelucchi et al., 2002). O padrão de expressão de genes *SEPALLATA* e de seus ortólogos é bastante diversificado em diferentes espécies de plantas. Sua expressão é reportada em meristema floral e primórdios de estames, pistilos, sendo que a expressão maior ocorre em óvulos em desenvolvimento (Savidge et al., 1995).

SEP1 e SEP2 em *Arabidopsis* e seus homólogos em arroz são encontrados no meristema floral e durante o desenvolvimento dos órgãos florais e sua expressão diminui à medida em que os órgão florais se desenvolvem (Ma et al. 1991; Flanagan and Ma 1994; Mandel and Yanofsky et al 1998; Pelucchi et al., 2002). Entretanto, o homólogo de SEP1 em milho (Lid et al., 2004), ZmMADS6, foi detectado por in situ preferencialmente nos tecidos zigóticos. BbrizSEP2 foi agrupado próximo aos homólogos de SEP1 e SEP2 de gramíneas e dicotiledôneas assemelhando-se mais a ZmMADS6 de milho. Apesar de ZmMADS6 ter sido classificado como SEP1, BbrizSEP2 apresentou o domínio SEP-I na região C-terminal muito similar ao mesmo domínio de SEP2 e por isso foi nomeada BbrizSEP2.

Os resultados de RT-qPCR, hibridização in situ e ensaios de duplo híbrido sugerem que BbrizSEP2 apresenta função de MADS-box da classe E. A expressão de *BbrizSEP2* foi detectada por RT-qPCR em tecidos

esporofíticos de ovários e anteras de *B. brizantha* apomítica e sexual. Entretanto, o nível de expressão desse gene foi muito baixo, não permitindo ainda melhor interpretação dos resultados. A baixa expressão de *BbrizSEP2* pode ser devida à realização de análises em ovários e anteras anteriores à antese. *ZmMADS6*, em milho, apresentou maior presença do gene após a fertilização. Portanto, como *BbrizSEP2* apresentou maior similaridade com a sequência de milho, sua expressão em tecidos após fertilização deverá ser testada. Neste trabalho, ovários e anteras pós antese não foram analisados visto que o foco desta tese foi a análise da possível relação desses genes com os eventos associados à formação de gametófitos em apomíticos, os quais ocorrem antes da antese.

Os ensaios de duplo híbrido com sequências de *Arabidopsis* e *B. brizantha* demonstraram que *BbrizSEP2* interagiu com proteínas das classes C e D de MADS-Box, indicando seu papel de mediador de interações com as proteínas que compõem os complexos multiméricos que determinam as identidades do carpelo e do óvulo. Os genes da classe E são importantes mediadores na formação de complexos multiméricos (Immink et al., 2009; Melzer & Theissen, 2009; Melzer et al., 2009).

*BbrizAGL6* apresenta dois domínios similares àqueles descritos previamente em diferentes espécies, *AGL6-I* e *AGL6-II*, incluindo monocotiledôneas e se assemelham aos domínios presentes na porção terminal de *SEP* (Zahn et al., 2005). Essas regiões são conhecidas por serem essenciais para interações proteína-proteína e ativação transcricional (Honma & Goto, 2001) conforme demonstrado em arroz (Ohmori et al., 2009). O domínio *AGL6-II* possui maior atividade em relação ao domínio *AGL6-I* (Ohmori et al., 2009). A substituição do ácido glutâmico, também encontrada em outras sequências proteicas de *MADS-box*, por ácido aspártico no domínio *AGL6-I* de *B.brizantha* pode não ser relevante, pois ambos os aminoácidos apresentam características polares e carga negativa. O segundo domínio, *AGL6-II*, é rico em resíduos de aminoácidos polares ácidos e é idêntico ao domínio de milho. As cargas negativas nesse domínio são cruciais para a estrutura de domínio de ativação (Ohmori et al., 2009).

As análises filogenéticas indicaram que a sequência predita de resíduos de aminoácidos de BbrizAGL6 é localizada juntamente com AGL6 de outras monocotiledôneas e é próxima também do grupo SEP, que, por sua vez, é bastante conservado em diversas espécies (Reinheimer & Kellogg, 2009). BbrizAGL6 pode ser incluído no mesmo clado que contem ZAG3 e ZAG5 de milho, OsMADS6 de arroz SbAGL6 de sorgo. Em gramíneas, os genes do tipo AGL6 apresentaram expressão em pálea, lodículas, óvulos e meristema floral e apresentam uma função do tipo SEPALLATA (Reinheimer & Kellogg, 2009; Li et al., 2011a). Foi demonstrado que AGL6 possui um papel na formação de órgãos florais em monocotiledôneas e dicotiledôneas (Viaene et al., 2010).

As análises de duplo híbrido com sequências de *B. brizantha* e *Arabidopsis* apontaram a habilidade de AGL6 em formar complexos multiméricos com fatores de transcrição do tipo MADS-box envolvidos na identidade do carpelo e do óvulo, semelhante à SEP (Moon et al., 1999; de Folter et al., 2005). SHP1 e SHP2, envolvidos com a abertura de frutos deiscentes (Liljegren et al., 2000), agem de modo redundante com STK em óvulos de *Arabidopsis* (Pinyopich et al., 2003) sendo agrupados no grupo monofilético de AG (Parenicova et al., 2003). Interações de BbrizAGL6 com SHP1, SHP2 e STK são observadas devido a BbrizAGL6 exercer uma função do tipo SEP. SEP3 é capaz de interagir com inúmeros MADS-box formando diversos complexos multiméricos. Por esse motivo, SEP3 foi comparado a uma cola na formação dos complexos multiméricos (Immink et al., 2009).

O complexo multimérico em *Brachiaria* pode estar relacionado às reproduções apomítica e sexual. *BbrizAGL6* possui expressão modulada em plantas apomítica e sexual e pode apresentar modulação também na formação do complexo multimérico.

Ensaio de duplo híbrido de OsMADS6, homólogo de AGL6, não apresentou interação com MADS-box das classes B e C. Entretanto, recentemente, foi demonstrado que OsMADS6 é o regulador chave dos níveis de transcrição de genes das classes B, C e E (Li et al., 2011a). Porém, ZAG3 de milho formou heterodímeros com MADS-box da classe C (Moon et al., 1999) (Thompson et al., 2009). Resultados similares foram observados com BbrizAGL6. Curiosamente, o domínio AGL6-II apresenta algumas diferenças

quando comparado com o mesmo domínio de *BbrizAGL6* e de *ZAG3*, que são idênticos. *BbrizAGL6* e *BbrizSEP2* apresentaram padrão semelhante de interação nos teste de duplo híbrido, porém somente *BbrizAGL6* forma homodímeros. Genes *SEP* e *AGL6* pertencem a clados muito próximos e apresentam sequências proteicas e padrão de expressão semelhantes ou que se sobrepõem em arroz e petúnia (Ohmori et al., 2009; Rijpkema et al., 2009). Ensaio de duplo e triplo híbrido de *A. thaliana* demonstraram que *AGL6* é capaz de interagir com *AG*, *APETALA1*, *SHP2* E *SEP3* (Parenicova et al., 2003; Immink et al., 2009). As interações observadas de *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6* com *SHP* também foram vistas com *STK* indicando que os clados *E* e de *AGL6* são capazes de interagir com o clado *AG*.

A expressão de *BbrizAGL6* em ovário durante a megasporogênese de *B. brizantha* sexual é consistente com os dados descritos em outras espécies. Em *Arabidopsis*, arroz e milho a expressão de *AGL6* é mais abundante em tecidos esporofíticos do óvulo a sua expressão é restrita ao órgão floral (Mena et al., 1995; Ohmori et al., 2009; Reinheimer & Kellogg, 2009; Koo et al., 2010).

Em arroz, o gene homólogo de *AGL6*, *OsMADS6*, foi detectado principalmente na MMC e nos micrósporos (Zhang et al., 2010). Embora não tenha sido relatado em outras espécies, em arroz, esse gene também se expressa no endosperma e embrião, estando envolvido na nutrição do embrião, porém, não é expresso nos tegumentos (Zhang et al., 2010).

Maior expressão de *BbrizAGL6*, detectada por RT-qPCR, em ovários da planta sexual em comparação à planta apomítica pode estar relacionada a eventos exclusivos à determinação do saco embrionário do tipo *Polygonum*, como a formação de um megásporo funcional e subsequente ocorrência de três divisões mitóticas. O pico de expressão detectado em ovários no estágio II corresponde ao momento em que MMC inicia a meiose para formar megásporos reduzidos. A localização da expressão de *BbrizAGL6* na MMC e na PMC, corroboram a idéia de que *BbrizAGL6* pode participar da formação de gametófitos. Em arroz, o sub-clado *AGL6* foi apontado como fator de transcrição preferencialmente expresso na PMC em um contexto de desenvolvimento onde é atribuída a participação de *AGL6* na meiose (Tang et al., 2010). Curiosamente, na planta apomítica, a região em que se encontra a

expressão de *BbrizAGL6* inclui a região nucelar próxima da MMC, onde AI se diferenciam para formar saco embrionário não-reduzido. Essas células não apresentam meiose, formando saco embrionário não-reduzido a partir de duas divisões mitóticas. A presença de *BbrizAGL6* em tecidos que apresentam células germinativas como MMC, PMC e AI, sugerem a relação da expressão desse gene com o desenvolvimento do gametófito reduzido e não-reduzido.

A função de *AGL6* ou *BbrizAGL6* em óvulos e nucelos foi avaliada em *Arabidopsis* contendo esses genes fusionados ao pSTK, isolado de *Arabidopsis* (Kooiker et al., 2005). As plantas com os transgenes dirigidos por pSTK apresentaram bloqueio no desenvolvimento dos sacos embrionários no estágio uninucleado (FG1), resultando em uma alta porcentagem de aborto de óvulos. Esse resultado mostra que a presença de *AGL6* após a meiose, no megásporo funcional, causa o bloqueio do processo mitótico característico da gametogênese. Esse resultado está de acordo com o observado na localização de *BbrizAGL6* em óvulos de plantas sexuais, em que se observou expressão em MMC, mas não durante a gametogênese. Em plantas apomíticas, a expressão de *BbrizAGL6* se estende à região de diferenciação de AI, e também neste caso, a expressão de *BbrizAGL6* não é observado durante o desenvolvimento do SE apomítico. É importante enfatizar que tanto no órgão reprodutivo masculino, como no feminino, incluindo sexual e apomítico, a presença de *BbrizAGL6* está relacionada a células que dão origem à linhagem germinativa (PMC, MMC e AI).

A regulação da diferenciação de células germinativas está em grande parte sob o controle de mecanismos epigenéticos relacionados a vias de pequenos RNAs, como evidenciado pelos fenótipos de mutações em diversos genes do tipo ARGONAUTA. O mutante *mel1* mostra defeitos na parte masculina e feminina em que megasporogênese é bloqueada, não ocorrendo meiose e, portanto levando à esterilidade (Nonomura et al., 2007). O gene *MEL1* é homólogo a *AGO1* de *Arabidopsis* e seu padrão de expressão é restrito à MMC, não ocorrendo após a meiose e durante a fase gametofítica, similar à *BbrizAGL6*. Em *Arabidopsis*, *AGO1* desempenha um papel central na regulação pós transcricional silenciando o gene *CLF* do grupo Polycomb, que mantém reprimidos os genes *KNOX*, *AG* e *AP3* em folhas e pólen (Goodrich et

al., 1997; Katz et al., 2004). *AG* pertence à família MADS-box, está envolvido na maturação de estames e carpelos e ativa o gene *SPL* que codifica um regulador chave para a esporogênese (Schieffhaller et al., 1999; Yang et al., 1999; Ito et al., 2004). Foi demonstrado que *AGL6* é capaz de formar dímeros com *AG*. Dessa forma, *AGO1*, que reprime *AG*, pode estar indiretamente envolvido na regulação de *AGL6*.

Mutação no gene *AGO5* de *Arabidopsis* apresenta o desenvolvimento do saco embrionário somente até a fase FG1, similar ao fenótipo de plantas que expressam os transgenes *pSTK::BbrizAGL6* ou *pSTK::AGL6*, indicando desenvolvimento do megásporo funcional até o momento que antecede a primeira divisão mitótica (Tucker et al., 2012). Em *Arabidopsis*, *AGO5* está presente nas células em volta da MMC, sugerindo que sua função está relacionada a um sinal de indução de gametogênese a partir de células somáticas. Perda de função do mutante ARGONAUTA (*ago9*) em *Arabidopsis* resulta em fenótipos em que várias células somáticas entram no programa gametofítico, característica que remete à apomixia (Olmedo-Monfil et al., 2010). Entretanto, mutações no gene homólogo de *AGO9* em milho, *AGO104*, também altera a megasporogênese e evita que células germinativas expressem características do programa somático (Garcia-Aguilar et al., 2010). Similar a *Arabidopsis*, *AGO104* também é expresso no tecido nucelar em volta da MMC (Garcia-Aguilar et al., 2010).

Curiosamente, em arroz, *OsMADS6*, homólogo de *AGL6*, é epigeneticamente regulado por meio de modificações de histonas e a sua expressão é bastante similar ao observado com *BbrizAGL6* em óvulos da planta sexual de *B. brizantha* (Zhang et al., 2010). É possível que os mecanismos epigenéticos estejam também presentes em óvulos da planta sexual de *B. brizantha*, como observado em *Arabidopsis* e milho, e que poderiam silenciar *BbrizAGL6* no nucelo prevenindo assim a formação de AI.

Em plantas apomíticas, esses mecanismos epigenéticos poderiam ser alterados na região nucelar, permitindo a expressão de diversos genes, incluindo *BbrizAGL6*, e então, permitindo a diferenciação de AI nesta região. O gene *AGO9*, por exemplo, poderia estar impedindo a expressão. Esse controle epigenético da expressão de *BbrizAGL6* e a sua presença no nucelo de óvulos

de plantas apomíticas poderia ser o gatilho para a ativação da via envolvida na apomixia. Dessa forma, *AGL6* também poderia estar envolvido em eventos que irão definir a megagametogênese e que irão determinar o destino das células germinativas tanto em plantas sexuais quanto apomíticas.

Recentemente foi descrito que a comunicação entre tecidos haplóides e diplóides é essencial para a formação do óvulo (Bencivenga et al., 2011; Mizzotti et al., 2012). Genes presentes no esporófito são capazes de interferir direta ou indiretamente no desenvolvimento do óvulo (Bencivenga et al., 2011). *AGL6* não é normalmente encontrado no tecido gametofítico durante a formação do saco embrionário e nos tegumentos da semente, derivados dos tegumentos do óvulo. Sua presença em tecidos gametofíticos durante o desenvolvimento do óvulo pode alterar a comunicação entre os tecidos haplóides e diplóides e assim interferir na formação correta do saco embrionário. Apesar de ainda ser uma via não elucidada, a existência de interação entre tegumentos e o desenvolvimento do saco embrionário vem sendo apontada em estudos de diversos mutantes esporofíticos que evidenciaram alterações severas na megagametogênese (Bencivenga et al., 2011).

Na reprodução apomítica, a interação entre tecidos esporofíticos e gametofíticos também se apresentou determinante para o surgimento de AI, células típicas da reprodução apomítica por aposporia. Koltunow e colaboradores, 2011, descreveram em *Hieracium* a formação da tétrade no megagametófito como necessária para a formação de AI no esporófito. A formação de AI foi apontada como resultante do estabelecimento de uma sinalização entre os tecidos, coexistentes, haplóide do gametófito e diplóide do esporófito.

O gene *AGL6*, específico de esporófito apresentou-se, em nosso trabalho, como um forte candidato no estabelecimento deste diálogo que poderá definir os diferentes modos de reprodução. A presença de *AGL6* em tecidos esporofíticos e gametofíticos interferiu no desenvolvimento do gametófito e, após a maturação do megagametófito, interferiu na formação do embrião. *AGL6*, portanto, de alguma forma participa na determinação do desenvolvimento do gametófito. Entretanto, seria necessário sua repressão



durante a gametogênese para a ocorrência de processos mitóticos e consequente desenvolvimento do saco embrionário e do embrião tanto em plantas apomíticas quanto sexuais.

## 6. Conclusões

A análise dos resultados obtidos leva às seguintes conclusões:

- *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6* são genes de *B. brizantha* identificados como do tipo MADS-box quanto à sequência proteica deduzida, ao padrão de expressão e à interação proteica.
- *BbrizAG1*, *BbrizAG2*, *BbrizSEP2* e *BbrizAGL6* são relacionados filogeneticamente com genes do tipo MADS-box de outras monocotiledôneas.
- *BbrizAG1* e *BbrizAG2* pertencem ao clado de AG e apresentam perfil de expressão de genes da classe C.
- *BbrizSEP2* pertence ao clado de SEP e apresenta perfil de expressão de genes da classe E.
- A expressão de *BbrizAGL6* em regiões que determinam o destino de células germinativas em plantas apomíticas e sexuais sugerem atuação na formação do gametófito de *B. brizantha*.
- *BbrizAGL6* e *AGL6* estão presentes no início da esporogênese e ausentes no tecido gametofítico durante as etapas seguintes de desenvolvimento do saco embrionário.
- *BbrizAGL6* e *AGL6* são genes candidatos à regulação do desenvolvimento do gametófito de plantas sexuais e apomíticas.
- Genes analisados do tipo MADS-box das classes C e E de *B. brizantha* podem estar envolvidos nas vias que regulam a determinação do tipo de reprodução sexual e apomítica.

## 7. Perspectivas

A regulação epigenética de *BbrizAGL6* deve ser investigada em óvulos de *B. brizantha* apomítica e sexual para elucidar sua relação com apomixia.

A confirmação da identidade das células do óvulo que apresentaram bloqueio no desenvolvimento com utilização de marcadores de MMC, de megásporo funcional e de gametófito maduro em plantas transgênicas poderá esclarecer se eventos meióticos ocorreram normalmente antes de haver o bloqueio do desenvolvimento.

As plantas transgênicas de *Arabidopsis* contendo pWM::*BbrizAGL6* e pWM::*AGL6* deverão ser analisadas quanto à expressão de *BbrizAGL6* e *AGL6* para investigar sua associação com o fenótipo verificado de aborto de sementes.

Análise dos genes alvos de *AGL6* poderá elucidar sua participação na formação do gametófito de plantas apomíticas e sexuais.

## Referências Bibliográficas

- Adams, K.L., Cronn, R., Percifield, R., Wendel, J.F. (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4649-4654.
- Albertini, E., Marconi, G., Barcaccia, G., Raggi, L., Falcinelli, M. (2004) Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. *Plant Mol Biol* 56: 879–894.
- Albertini, E., Marconi, G., Reale, L., Barcaccia, G., Porceddu, A., Ferranti, F., Falcinelli, M. (2005) SERK and APOSTART. candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. *Plant Physiol* 138: 2185-2199.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F., Yanofsky, M.F. (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* 24: 457-466.
- Alves, E.R., Carneiro, V., Araujo, A. (2001) Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Sex Plant Reprod* 14: 207-212.
- Alves, E.R., Carneiro, V.T.C., Dusi, D.M.A. (2007) In situ localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. *Protoplasma* 231: 161-171.
- Angenent, G.C., Colombo, L. (1996) Molecular control of ovule development. *Trends Plant Sci* 1: 228-232.
- Angenent, G.C., Franken, J., Busscher, M., van Dijken, A., van Went, J.L., Dons, H.J., van Tunen, A.J. (1995) A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell* 7: 1569-1582.
- Araújo, A.C.G., Alves, E.R., Penteado, M.I.O., Carneiro, V.T.C. Analysis of apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae) endosperm; (2000a); Banff-Alberta, Canadá. pp. 79.
- Araújo, A.C.G., Mukhambetzhonov, S., Pozzobon, M.T., Santana, E.F., Carneiro, V.T.C. (2000b) Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Rév Cytol Biol Végétales - Le Botaniste Tome XXIII (1-2):*13-28
- Araújo, A.C.G., Nobrega, J.M., Pozzobon, M.T., Carneiro, V.T.C. (2005) Evidence of sexuality in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) artificial tetraploid plants and progeny. *Euphytica* 144: 39-50.
- Asker, S.E., Jerling, L. (1992) Apomixis in Plants. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Inc. 298 p.

- Becker, A., Theissen, G. (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* 29: 464-489.
- Bemer, M., Heijmans, K., Airoldi, C., Davies, B., Angenent, G.C. (2010) An atlas of type i mads box gene expression during female gametophyte and seed development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154: 287-300.
- Bemer, M., Wolters-Arts, M., Grossniklaus, U., Angenent, G.C. (2008) The MADS domain protein DIANA acts together with agamous-like80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules. *The Plant Cell Online* 20: 2088-2101.
- Bencivenga, S., Colombo, L., Masiero, S. (2011) Cross talk between the sporophyte and the megagametophyte during ovule development. *Sex Plant Reprod* 24: 113-121.
- Berger, F., Hamamura, Y., Ingouff, M., Higashiyama, T. (2008) Double fertilization – caught in the act. *Trends Plant Sci* 13: 437-443.
- Bey, M., Stuber, K., Fellenberg, K., Schwarz-Sommer, Z., Sommer, H., Saedler, H., Zachgo, S. (2004) Characterization of *Antirrhinum* petal development and identification of target genes of the class B MADS box gene *DEFICIENS*. *Plant Cell* 16: 3197-3215.
- Bicknell, R.A., Koltunow, A.M. (2004) Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell* 16: S228-S245.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V.K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., van Lammeren, A.A.M., Miki, B.L.A., Custers, J.B.M., van Lookeren Campagne, M.M. (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell Online* 14: 1737-1749.
- Bowman, J. (1997) Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. *J Biosciences* 22: 515-527.
- Bowman, J.L., Baum, S.F., Eshed, Y., Putterill, J., Alvarez, J. (1999) Molecular genetics of gynoecium development in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* 45: 155-205.
- Bowman, J.L., Drews, G.N., Meyerowitz, E.M. (1991) Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell* 3: 749-758.
- Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M. (1991) Genetic control of pattern formation during flower development in *Arabidopsis*. *Symp Soc Exp Biol* 45: 89-115.

- Bowman, J.L., Smyth, D.R. (1999) *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* 126: 2387-2396.
- Brambilla, V., Battaglia, R., Colombo, M., Masiero, S., Bencivenga, S., Kater, M.M., Colombo, L. (2007) genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS Box Factors support ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2544-2556.
- Calzada, J.-P.V., Crane, C.F., Stelly, D.M. (1996) Apomixis—the asexual revolution. *Science* 274: 1322-1323.
- Carman, J.G. (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. *Biological-Journal-of-the-Linnean-Society* 61: 51-94.
- Carman, J.G. (2004) Apomixis for crop production: Status of technology development and commercialization implications. *Willamette J Intern Law Dispute Resol*: 28-48.
- Carman, J.G. (2008) Ovules of apomictic *Boecheira* suppress maleness but invest precociously in filial development - typical behaviors for apomictic eukaryotes in XX Intern. Cong. Sex. Plant Reprod.; Documentos Embrapa 259 Brasilia-DF. pp. 87-88.
- Carneiro VTC, Dusi.D.M.A., Ortiz JPA (2006) Apomixis: ocurrence, applications and improvements. /In/ JAT Silva, ed, Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and Tropical Issues. Ikenobe,Japan: Global Science Books. p 659 p.
- Causier, B., Kieffer, M., Davies, B. (2002) Plant biology. MADS-box genes reach maturity. *Science* 296: 275-276.
- Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., Davies, B. (2010) Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol* 21: 73-79.
- Chaudhury, A., Ming, L., Miller, C., Craig, S., Dennis, E., Peacock, W. (1997) Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4223 - 4228.
- Cho, S., Jang, S., Chae, S., Chung, K.M., Moon, Y.H., An, G., Jang, S.K. (1999) Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* APETALA1 as a transcription activation domain. *Plant Mol Biol* 40: 419-429.
- Ciaffi, M., Paolacci, A., Tanzarella, O., Porceddu, E. (2011) Molecular aspects of flower development in grasses. *Sex Plant Reprod* 24: 247-282.
- Clifford, H.T. (1987) Spikelet and floral morphology. . Grass Systematics and Evolution: Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press. pp. 21–30.

- Clough, S.J., Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium-mediated* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.
- Coen, E.S., Meyerowitz, E.M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Colombo, L., Franken, J., Koetje, E., van Went, J., Dons, H.J., Angenent, G.C., van Tunen, A.J. (1995) The petunia MADS box gene *FPB11* determines ovule identity. *Plant Cell* 7: 1859-1868.
- Colombo, M., Masiero, S., Vanzulli, S., Lardelli, P., Kater, M.M., Colombo, L. (2008) *AGL23*, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 54: 1037-1048.
- Conner, J.A., Goel, S., Gunawan, G., Cordonnier-Pratt, M.-M., Johnson, V.E., Liang, C., Wang, H., Pratt, L.H., Mullet, J.E., DeBarry, J., Yang, L., Bennetzen, J.L., Klein, P.E., Ozias-Akins, P. (2008) sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the Apospory-Specific Genomic Region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. *Plant Physiology* 147: 1396-1411.
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H., Sommer, H. (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *Embo J* 15: 4330-4343.
- Davies, B., Schwarz-Sommer, Z. (1994) Control of floral organ identity by homeotic MADS-box transcription factors. *Results Probl Cell Differ* 20: 235-258.
- d'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., Mercier, R. (2009) Turning Meiosis into Mitosis. *PLoS Biol* 7: e1000124.
- De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y., Theißen, G. (2003) And then there were many: MADS goes genomic. *Trends Plant Sci* 8: 475-483.
- Dickinson, H.G., Grant-Downton, R. (2009) Bridging the generation gap: flowering plant gametophytes and animal germlines reveal unexpected similarities. *Biological Reviews* 84: 589-615.
- Drews, G.N., Wang, D., Steffen, J.G., Schumaker, K.S., Yadegari, R. (2011) Identification of genes expressed in the angiosperm female gametophyte. *J Exp Bot* 62: 1593-1599.
- Dusi, D.M.A., Araújo, A.C.G., Alves, E.R., Valle, C.B.d., Carneiro, V.T.C. (2004) Estudo da polinização e fecundação no gênero *Brachiaria*. In: Carneiro VTC, Dusi DMA, editors. Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. pp. 81-100.

- Dusi, D.M.A., Willemse, M.T.M. (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 41: 151-162.
- Dwivedi, K.K., Roche, D., Carman, J.G. (2010) Expression in *Arabidopsis* of a nucellus-specific promoter from watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Science* 179: 549-552.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., Sommer, H. (1999) 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* 18: 5370-5379.
- Fan, J., Li, W., Dong, X., Guo, W., Shu, H. (2007) Ectopic expression of a hyacinth *AGL6*; homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in *Arabidopsis*. *Science in China Series C: Life Sciences* 50: 676-689.
- Favaro, R., Immink, R.G., Ferioli, V., Bernasconi, B., Byzova, M., Angenent, G.C., Kater, M., Colombo, L. (2002) Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein-protein interactions in monocot and dicot plants. *Mol Genet Genomics* 268: 152-159.
- Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M.F., Kater, M.M., Colombo, L. (2003) MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2603-2611.
- Fisher, M.J., Kerridge, P.C. (1996) The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: Miles J. W, Maass B. L, Valle C. B., editors. *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. Cali-Colombia, Campo Grande-Brasil: CIAT-Embrapa. pp. 288p.
- Folter, S.d., Angenent, G.C. (2006) trans meets cis in MADS science. *Trends Plant Sci* 11: 224-231.
- Folter, S., Immink, R.G., Kieffer, M., Parenicova, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell* 17: 1424-1433.
- Fornara, F., Parenicova, L., Falasca, G., Pelucchi, N., Masiero, S., Ciannamea, S., Lopez-Dee, Z., Altamura, M.M., Colombo, L., Kater, M.M. (2004) Functional characterization of *OsMADS18*, a member of the *AP1/SQUA* subfamily of MADS box genes. *Plant Physiol* 135: 2207-2219.
- Garcia-Aguilar, M., Michaud, C., Leblanc, O., Grimanelli, D. (2010) Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. *Plant Cell* 22: 3249-3267.



- Gobbe, J., Swenne, A., Louant, B.-P. (1981) Diploïdes naturels et autotetraploïdes induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard: critères d'identification. *Agron Top* 36: 339-346.
- Goodrich, J., Puangsomlee, P., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M., Coupland, G. (1997) A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386: 44-51.
- Gramzow, L., Theissen, G. (2010) A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biology* 11: 214.
- Guerin, J., Rossel, J.B., Robert, S., Tsuchiya, T., Koltunow, A. (2000) A *DEFICIENS* homologue is down-regulated during apomictic initiation in ovules of *Hieracium*. *Planta* 210: 914-920.
- Hanna, W.W., Bashaw, E.C. (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sci* 27: 1136-1139.
- Honma, T., Goto, K. (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409: 525-529.
- Hsu, H.F., Huang, C.H., Chou, L.T., Yang, C.H. (2003) Ectopic expression of an orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 44: 783-794.
- Immink, R., Tonaco, I., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A., Busscher-Lange, J., Borst, J., Angenent, G. (2009) SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology* 10: R24.
- Irish, V.F. (2003) The evolution of floral homeotic gene function. *BioEssays* 25: 637-646.
- Ito, T., Ng, K.-H., Lim, T.-S., Yu, H., Meyerowitz, E.M. (2007) The homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: tpc.107.055467.
- Ito, T., Wellmer, F., Yu, H., Das, P., Ito, N., Alves-Ferreira, M., Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M. (2004) The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*. *Nature* 430: 356-360.
- Kang, I.-H., Steffen, J.G., Portereiko, M.F., Lloyd, A., Drews, G.N. (2008) The *AGL62* MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 20: 635-647.
- Karia, C.T., Duarte, J.B., Araujo, A.C.G. (2006) Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil.; Planaltina DEC, editor. 58p p.

- Kater, M.M., Dreni, L., Colombo, L. (2006) Functional conservation of MADS-box factors controlling floral organ identity in rice and *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57: 3433-3444.
- Katz, A., Oliva, M., Mosquna, A., Hakim, O., Ohad, N. (2004) FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant J.* 37: 707-719.
- Kohler, C., Hennig, L., Spillane, C., Pien, S., Gruissem, W., Grossniklaus, U. (2003) The Polycomb-group protein *MEDEA* regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes Dev* 17: 1540-1553.
- Koltunow, A., Grossniklaus, U. (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Annu Rev Biol* 54: 547 - 574.
- Koltunow, A.M. (1993) Apomixis : Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1437.
- Koltunow, A.M., Johnson, S.D., Bicknell, R.A. (1998) Sexual and apomictic development in *Hieracium*. *Sex Plant Reprod* 11: 213-230.
- Koltunow, A.M.G., Johnson, S.D., Rodrigues, J.C.M., Okada, T., Hu, Y., Tsuchiya, T., Wilson, S., Fletcher, P., Ito, K., Suzuki, G., Mukai, Y., Fehrer, J., Bicknell, R.A. (2011) Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. *Plant J* 66: 890-902.
- Koo, S.C., Bracko, O., Park, M.S., Schwab, R., Chun, H.J., Park, K.M., Seo, J.S., Grbic, V., Balasubramanian, S., Schmid, M., Godard, F., Yun, D.-J., Lee, S.Y., Cho, M.J., Weigel, D., Kim, M.C. (2010) Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box Gene *AGAMOUS-LIKE6*. *Plant J* 62: 807-816.
- Kooiker, M., Airoidi, C.A., Losa, A., Manzotti, P.S., Finzi, L., Kater, M.M., Colombo, L. (2005) *BASIC PENTACYSTEINE1*, a GA binding protein that induces conformational changes in the regulatory region of the homeotic *Arabidopsis* gene *SEEDSTICK*. *Plant Cell* 17: 722-729.
- Kramer, E.M., Jaramillo, M.A., Di Stilio, V.S. (2004) Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the AGAMOUS subfamily of MADS box genes in angiosperms. *Genetics* 166: 1011-1023.
- Krizek, B.A., Fletcher, J.C. (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* 6: 688-698.
- Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I., Nei, N. (2000) MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0 ed. Arizona: Pennsylvania and Arizona State University, University Park, Pennsylvania and Tempe.

- Kyozuka, J., Shimamoto, K. (2002) Ectopic expression of *OsMADS3*, a rice ortholog of *AGAMOUS*, caused a homeotic transformation of lodicules to stamens in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 43: 130-135.
- Li, H., Liang, W., Hu, Y., Zhu, L., Yin, C., Xu, J., Dreni, L., Kater, M.M., Zhang, D. (2011a) Rice MADS6 Interacts with the Floral Homeotic Genes *SUPERWOMAN1*, *MADS3*, *MADS58*, *MADS13*, and *DROOPING LEAF* in Specifying Floral Organ Identities and Meristem Fate. *Plant Cell* 23: 2536-2552.
- Li, H., Liang, W., Yin, C., Zhu, L., Zhang, D. (2011b) Genetic interaction of *OsMADS3*, *DROOPING LEAF*, and *OsMADS13* in specifying rice floral organ identities and meristem determinacy. *Plant Physiol* 156: 263-274.
- Lid, S.E., Meeley, R.B., Min, Z., Nichols, S., Olsen, O.-A. (2004) Knock-out mutants of two members of the AGL2 subfamily of MADS-box genes expressed during maize kernel development. *Plant Sci* 167: 575-582.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L., Yanofsky, M.F. (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770.
- Liu, J., Qu, L.-J. (2008) Meiotic and mitotic cell cycle mutants involved in gametophyte development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 1: 564-574.
- Ma, H., Yanofsky, M.F., Meyerowitz, E.M. (1991) *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev* 5: 484-495.
- Marimuthu, M.P.A., Jolivet, S., Ravi, M., Pereira, L., Davda, J.N., Cromer, L., Wang, L., Nogué, F., Chan, S.W.L., Siddiqi, I., Mercier, R. (2011) Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds. *Science* 331: 876.
- Matias-Hernandez, L., Battaglia, R., Galbiati, F., Rubes, M., Eichenberger, C., Grossniklaus, U., Kater, M.M., Colombo, L. (2010) *VERDANDI* is a direct target of the mads domain ovule identity complex and affects embryo sac differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 1702-1715.
- McSteen, P., Laudencia-Chingcuanco, D., Colasanti, J. (2000) A floret by any other name: control of meristem identity in maize. *Trends Plant Sci* 5: 61-66.
- Melzer, R., Theissen, G. (2009) Reconstitution of 'floral quartets' in vitro involving class B and class E floral homeotic proteins. *Nucl Acids Res* 37: 2723-2736.
- Melzer, R., Verelst, W., Theissen, G. (2009) The class E floral homeotic protein *SEPALLATA3* is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes in vitro. *Nucl Acids Res* 37: 144-157.

- Mena, M., Ambrose, B.A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Yanofsky, M.F., Schmidt, R.J. (1996) Diversification of C-function activity in maize flower development. *Science* 274: 1537-1540.
- Mena, M., Mandel, M.A., Lerner, D.R., Yanofsky, M.F., Schmidt, R.J. (1995) A characterization of the MADS-box gene family in maize. *Plant J* 8: 845-854.
- Mizzotti, C., Mendes, M.A., Caporali, E., Schnittger, A., Kater, M.M., Battaglia, R., Colombo, L. (2012) The MADS box genes *SEEDSTICK* and *ARABIDOPSIS Bsister* play a maternal role in fertilization and seed development. *Plant J* doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04878.x
- Moon, Y.H., Kang, H.G., Jung, J.Y., Jeon, J.S., Sung, S.K., An, G. (1999) Determination of the motif responsible for interaction between the rice APETALA1/AGAMOUS-LIKE9 family proteins using a yeast two-hybrid system. *Plant Physiol* 120: 1193-1204.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T. (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104: 34-41.
- Ng, K.-H., Yu, H., Ito, T. (2009) *AGAMOUS* Controls *GIANT KILLER*, a multifunctional chromatin modifier in reproductive organ patterning and differentiation. *PLoS Biol* 7: e1000251.
- Nielen, S., Almeida, L., Carneiro, V., Araujo, A. (2010) Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. *Sex Plant Reprod* 23: 45-51.
- Nogler, G.A. (1984) Gametophytic apomixis. In: Johri BM, editor. Embriology of Angiosperms. Berlin: Springer-Verlag. pp. 475-518.
- Nonomura, K.-I., Miyoshi, K., Eiguchi, M., Suzuki, T., Miyao, A., Hirochika, H., Kurata, N. (2003) The *MSP1* gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *The Plant Cell Online* 15: 1728-1739.
- Nonomura, K.-I., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., Kurata, N. (2007) A germ cell-specific gene of the *ARGONAUTE* family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* 19: 2583-2594.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., Treisman, R. (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55: 989-1003.
- Ohad, N., Margossian, L., Hsu, Y.-c., Williams, C., Repetti, P., Fischer, R.L. (1996) A mutation that allows endosperm development without

- fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5319-5324.
- Ohmori, S., Kimizu, M., Sugita, M., Miyao, A., Hirochika, H., Uchida, E., Nagato, Y., Yoshida, H. (2009) *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an *AGL6*-Like MADS Box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice. *Plant Cell* 21: 3008-3025.
- Olmedo-Monfil, V., Duran-Figueroa, N., Arteaga-Vazquez, M., Demesa-Arevalo, E., Aufran, D., Grimaneli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A., Vielle-Calzada, J.-P. (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464: 628-632.
- Ozias-Akins, P. (2006) Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Crit Rev Plant Sci* 25: 199-214.
- Ozias-Akins, P., Lubbers, E.L., Hanna, W.W., McNay, J.W. (1993) Transmition of the apomitic mode of reproduction in *Pennisetum* : co-inheritance of the trait and molecular markers. *TAG* 85: 632-638.
- Pagnussat, G.C., Alandete-Saez, M., Bowman, J.L., Sundaresan, V. (2009) auxin-dependent patterning and gamete specification in the *arabidopsis* female gametophyte. *Science* 324: 1684-1689.
- 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. (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete mads-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15: 1538-1551.
- Passmore, S., Maine, G.T., Elble, R., Christ, C., Tye, B.K. (1988) *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT alpha cells. *J Mol Biol* 204: 593-606.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F. (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.
- Pelaz, S., Tapia-Lopez, R., Alvarez-Buylla, E.R., Yanofsky, M.F. (2001) Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 11: 182-184.
- Pelucchi, N., Fornara, F., Favalli, C., Masiero, S., Lago, C., Pè, E.M., Colombo, L., Kater, M.M. (2002) Comparative analysis of rice MADS-box genes expressed during flower development. *Sex Plant Reprod* 15: 113-122.
- Pinheiro, A.A., Pozzobon, M.T., Valle, C.B., Penteado, M.I.O., Carneiro, V.T.C. (2000) Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants, using colchicine. *Plant Cell Rep* 19: 274-278.

- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F. (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424: 85-88.
- Polaquini, L.E.M., Souza, J.G., Gebara, J.J. (2006) Transformações técnico-podutivas e comerciais na pecuária de corte brasileira a partir da década de 90. . *R Bras Zootec* 35: 321-327.
- Portereiko, M., Lloyd, A., Steffen, J., Punwani, J., Otsuga, D., Drews, G. (2006) *AGL80* is required for central cell and endosperm development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1862 - 1872.
- Purugganan, M.D., Rounsley, S.D., Schmidt, R.J., Yanofsky, M.F. (1995) Molecular evolution of flower development: diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics* 140: 345-356.
- Quarin, C.L., Espinoza, F., Martinez, E.J., Pessino, S.C., Bovo, O.A. (2001) A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. *Sex Plant Reprod* 13: 243-249.
- Quarin, C.L., Hanna, W.W. (1980) Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Sci* 20: 69-75.
- Quarin, C.L., Norrmann, G.A., Espinoza, F. (1998) Evidence for autopoloidy in apomictic *Paspalum rufum*. *Herditas* 129: 119-124.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2005) Biology of plants. New York: W.H. Freeman and Co.
- Ravi, M., Marimuthu, M.P.A., Siddiqi, I. (2008) Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature* 451: 1121-1124.
- Reinheimer, R., Kellogg, E.A. (2009) Evolution of *AGL6-like* MADS Box genes in grasses (*Poaceae*): ovule expression is ancient and palea expression is new. *Plant Cell* 21: 2591-2605.
- Renvoize, S.A., Clayton, W.D., Kabuye, C.H.S. (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: Miles JW, Maass BL, al e, editors. *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. Cali, Colombia Campo Grande, Brasil:: CIAT-EMBRAPA. pp. 1-15.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., -Z. , C., Jiang, Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., -L. Yu, G. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.
- Riechmann, J.L., Krizek, B.A., Meyerowitz, E.M. (1996) Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 4793-4798.

- Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M. (1997) 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* 8: 1243-1259.
- Rijpkema, A.S., Zethof, J., Gerats, T., Vandenbussche, M. (2009) The petunia *AGL6* gene has a SEPALLATA-like function in floral patterning. *Plant J* 60: 1-9.
- Rodrigues, J.C.M., Cabral, G.B., Dusi, D.M.A., Mello, L.V., Rigden, D., Carneiro, V.T.C. (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Mol Biol* 53: 745-757.
- Rodrigues, J.C.M., Tucker, M.R., Johnson, S.D., Hrmova, M., Koltunow, A.M.G. (2008) sexual and apomictic seed formation in *Hieracium* requires the plant polycomb-group gene FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM. *Plant Cell* 20: 2372-2386.
- Rounsley, S.D., Ditta, G.S., Yanofsky, M.F. (1995) Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 7: 1259-1269.
- Rozen, S., Skaletsky, J.H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S MSe, editor. Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa: Humana Press,. pp. 365-386.
- Sakai, H., Krizek, B.A., Jacobsen, S.E., Meyerowitz, E.M. (2000) Regulation of *SUP* expression identifies multiple regulators involved in *Arabidopsis* floral meristem development. *Plant Cell* 12: 1607-1618.
- Salariato, D., Morrone, O., Zuloaga, F.O. (2008.) Ornamentation pattern of the upper anthecium in *Urochloa* and related genera (Poaceae, Panicoideae, Paniceae): its systematic value. . *Darwiniana (San Isidro)* v.46: 335-355.
- Savidge, B., Rounsley, S.D., Yanofsky, M.F. (1995) Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* 7: 721-733.
- Schauer, S.E., Schlüter, P.M., Baskar, R., Gheyselinck, J., Bolaños, A., Curtis, M.D., Grossniklaus, U. (2009) Intronic regulatory elements determine the divergent expression patterns of *AGAMOUS-LIKE6* subfamily members in *Arabidopsis*. *Plant J* 59: 987-1000.
- Schiefthaler, U., Balasubramanian, S., Sieber, P., Chevalier, D., Wisman, E., Schneitz, K. (1999) Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1164-11669.

- Schmidt, E.D., Guzzo, F., Toonen, M.A., de Vries, S.C. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062.
- Schmidt, R.J., Veit, B., Mandel, M.A., Mena, M., Hake, S., Yanofsky, M.F. (1993) Identification and molecular characterization of *ZAG1*, the maize homolog of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Plant Cell* 5: 729-737.
- Schneitz, K., Hülskamp, M., Pruitt, R.E. (1995) Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J* 7: 731-749.
- Scutt, C.P., Vinauger-Douard, M., Fourquin, C., Finet, C., Dumas, C. (2006) An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *J Exp Bot* 57: 2143-2152.
- Seldulsky, T. (1978) *Brachiaria*: Taxonomy of cultivated and native species in Brazil. *Hoehnea* 7: 99-139.
- Sheridan, W.F., Avalkina, N.A., Shamrov, I.I., Batygina, T.B., Golubovskaya, I.N. (1996) The *MAC1* Gene: controlling the commitment to the meiotic pathway in maize. *Genetics* 142: 1009-1020.
- Sheridan, W.F., Golubeva, E.A., Abrhamova, L.I., Golubovskaya, I.N. (1999) The *mac1* mutation alters the developmental fate of the hypodermal cells and their cellular progeny in the maize anther. *Genetics* 153: 933-941.
- Shimamoto, K., Kyojuka, J. (2002) Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 399-419.
- Shirasuna, R.T. (2010.) *Urochloa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Silveira, E.D., Alves-Ferreira, M., Guimaraes, L.A., da Silva, F.R., CARNEIRO, V.T.C. (2009) Selection of reference genes for quantitative real time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol* 9: 84.
- Silveira, E.D., Guimarães, L.A., Dusi, D.M.A., da Silva, F.R., Martins, N.F., do Carmo Costa, M., Alves-Ferreira, M., Carneiro, V.T.C. (2012) Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. *Plant Cell Rep* 31 (2): 403-416
- Singh, M., Burson, B., Finlayson, S. (2007) Isolation of candidate genes for apomictic development in buffelgrass (*Pennisetum ciliare*). *Plant Mol Biol* 64: 673-682.
- Singh, M., Goel, S., Meeley, R.B., Dantec, C., Parrinello, H., Michaud, C., Leblanc, O., Grimanelli, D. (2011) Production of viable gametes without



- meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE Protein. *Plant Cell* 23: 443–458.
- Sommer, H., Beltran, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lonig, W.E., Saedler, H., Schwarz-Sommer, Z. (1990) *DEFICIENS*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J* 9: 605-613.
- Spielman, M., Vinkenoog, R., Scott, J.R. (2003) Genetic mechanisms of apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358: 1095-1103.
- Spillane, C., Curtis, M.D., Grossniklaus, U. (2004) Apomixis technology development-virgin births in farmers' fields? *Nat Biotechnol* 22: 687-691.
- Steffen, J.G., Kang, I.-H., Portereiko, M.F., Lloyd, A., Drews, G.N. (2008) AGL61 Interacts with AGL80 and is required for central cell Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 148: 259-268.
- Sundaresan, V., Alandete-Saez, M. (2010) Pattern formation in miniature: the female gametophyte of flowering plants. *Development* 137: 179-189.
- Tang, X., Zhang, Z.-Y., Zhang, W.-J., Zhao, X.-M., Li, X., Zhang, D., Liu, Q.-Q., Tang, W.-H. (2010) Global gene profiling of laser-captured pollen mother cells indicates molecular pathways and gene subfamilies involved in rice meiosis. *Plant Physiology* 154: 1855-1870.
- Theissen, G. (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 4: 75-85.
- Theissen, G., Kim, J.T., Saedler, H. (1996) Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J Mol Evol* 43: 484-516.
- Thompson, B.E., Bartling, L., Whipple, C., Hall, D.H., Sakai, H., Schmidt, R., Hake, S. (2009) bearded-ear Encodes a MADS Box Transcription Factor Critical for Maize Floral Development. *Plant Cell* 21: 2578-2590.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Toshiro, I., Wellmer, F., Yu, H., Das, P., Ito, N., Ferreira, M.A., Riechmann, J.A., Meyerowitz, E. (2004) The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*. *Nature* 430: 356-360.
- Tucker, M.R., Okada, T., Hu, Y., Scholefield, A., Taylor, J.M., Koltunow, A.M.G. (2012) Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of

megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development* 139:1399-1404

- Tzeng, T.Y., Yang, C.H. (2001) A MADS box gene from lily (*Lilium Longiflorum*) is sufficient to generate dominant negative mutation by interacting with PISTILLATA (PI) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42: 1156-1168.
- Valle, C.B., Bonato, A.L.V., Pagliarini, S., Resende, R.M.S., Jank, L. (2004) Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. . In: Carneiro VTC, Dusi DMA, editors. Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia. Brasília- DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. pp. 47-65.
- Valle, C.B., Glienke, C., Leguisamon, G.O.C. (1994) Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter* 7: 42-43.
- Valle, C.B., Savidan, Y. (1996) Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CBd, editors. *Brachiaria: Biology, agronomy and improvement*. Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA. pp. 288.
- Verwoerd, T., Dekker, B., Hoekema, A. (1989) Procedure for the rapid isolation of plant RNA. *Nucleic Acids Res* 17: 2362.
- Viaene, T., Vekemans, D., Becker, A., Melzer, S., Geuten, K. (2010) Expression divergence of the AGL6 MADS domain transcription factor lineage after a core eudicot duplication suggests functional diversification. *BMC Plant Biol* 10: 148.
- Walbot, V., Evans, M.M.S. (2003) Unique features of the plant life cycle and their consequences. *Nat Rev Genet* 4: 369-379.
- Wang, H., Caruso, L.V., Downie, A.B., Perry, S.E. (2004) The Embryo MADS Domain Protein AGAMOUS-Like 15 Directly Regulates Expression of a Gene Encoding an Enzyme Involved in Gibberellin Metabolism. *Plant Cell* 16: 1206–1219.
- Watson, L., Dallwitz, M.J. (1992) Grass genera of the world. Wallingford, UK: CAB International.
- Weigel, D., Meyerowitz, E.M. (1994) The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78: 203-209.
- Wilkinson, J.E., Twell, D., Lindsey, K. (1997) Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *J Exp Bot* 48: 265-275.
- Yadegari, R., Paiva, G., Laux, T., Koltunow, A., Apuya, N., Zimmerman, J., Fischer, R., Harada, J., Goldberg, R. (1994) Cell differentiation and

- morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis* raspberry embryos. *Plant Cell* 6: 1713 - 1729.
- Yamaguchi, T., Lee, D.Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., Hirano, H.Y. (2006) Functional Diversification of the Two C-Class MADS Box Genes *OsMADS3* and *OsMADS58* in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 18: 15-28.
- Yang, W., Ye, D., Xu, J., Sundaresan, V. (1999) The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev* 13: 2108 - 2117.
- Yang, Y., Jack, Thomas (2004) Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Mol Biol* 55: 45-59.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., Meyerowitz, E.M. (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346: 35-39.
- Zahn, L.M., Kong, H., Leebens-Mack, J.H., Kim, S., Soltis, P.S., Landherr, L.L., Soltis, D.E., de Pamphilis, C.W., Ma, H. (2005) The Evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-Box genes: a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics* 169: 2209-2223.
- Zhang, H., Forde, B.G. (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407-409.
- Zhang, J., Nallamilli, B.R., Mujahid, H., Peng, Z. (2010) *OsMADS6* plays an essential role in endosperm nutrient accumulation and is subject to epigenetic regulation in rice (*Oryza sativa*). *Plant J* 64: 604-617.
- Zhang, J.Z. (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 6: 430-440.