Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

ANDRÉA DIAS KOEHLER

Reprodução em *Brachiaria* spp.:
SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase)
no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese

Piracicaba

2010

ANDRÉA DIAS KOEHLER

Reprodução em *Brachiaria* spp.:
SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase)
no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente

Orientadora: Prof^a Dra. Adriana Pinheiro Martinelli
Co-orientadora: Dra. Vera Tavares de Campos
Carneiro

Piracicaba
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Koehler, Andréa Dias

Reprodução em *Brachiaria* spp.: *SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase)* no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese / Andréa Dias Koehler; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - Piracicaba, 2010.

108 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cultura de tecidos 2. Expressão gênica 3. Forrageiras 4. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDU 577.21:633.3

Dedicatória

Aos meus queridos pais Franz Koehler e Ana Lúcia Dias Koehler, pelo amor incondicional e aos meus irmãos Harley, Adriane, Álysson, Andressa e Anderson, cunhados e sobrinhos que me acompanharam nesta trajetória. Amo muito vocês!

À escola pública brasileira que apesar de todas as dificuldades tem colaborado à formação do cidadão e a qualificação profissional,

e a todos os mestres que passaram por toda minha vida acadêmica. Sem eles seria impossível a realização deste sonho!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus “princípio de toda sabedoria” pela salvação, sustento de cada dia e por todas as experiências vividas ao longos destes quatro anos.

A toda minha família pelo apoio incondicional, pelo convívio em harmonia e palavras de carinho nos momentos difíceis.”

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela oportunidade concedida para realização do curso.

A todos os professores desta Universidade pelos conhecimentos acrescentados.

À Embrapa Recurso Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), em Brasília-DF, pelo recurso e suporte técnico para realização desta tese.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À minha orientadora, professora Dra. Adriana Pinheiro Martinelli pela oportunidade e orientação, na maioria das vezes à distância, mas com muita sabedoria e sempre com uma palavra de apoio! “Adriana obrigada por tudo, principalmente pela paciência!”

À Dra. Diva Dusi, da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia por todos ensinamentos e apoio na conclusão deste trabalho, pela amizade e por me proporcionar momentos felizes com sua família em datas importantes como dia das mães e Natal, quando não era possível estar com meus familiares.

À Dra. Vera Carneiro, coodenadora do Laboratório de Reprodução Vegetal (LRV) e da pesquisa sobre apomixia, também por todos os ensinamentos, pelas palavras de apoio, paciência e por toda ajuda para finalização deste trabalho.

À Dra. Ana Claudia Guerra Araújo, coordenadora do Laboratório de Microscopia da Embrapa, pelas palavras de apoio e ajuda na concretização deste trabalho.

À amiga Gláucia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todo apoio desde minha chegada em Brasília. Pelos ensinamentos no laboratório, pelas palavras sábias em momentos difíceis e pelos almoços e cafés recheados de muita alegria em sua casa. “Glau serei sempre grata por tudo que fez por mim!”

Às amigas Larissa e Ana Luiza, doutorandas do LRV da Embrapa, pela amizade e convivência em harmonia no laboratório. Por tudo o que vocês me ensinaram, principalmente, na parte de clonagem gênica. Vocês foram minhas conselheiras! Valeu também pelos almoços e festinhas, tornando minha permanência muito mais agradável nesta cidade! Amigas desejo muito sucesso a vocês!

Ao Dr. Júlio Carlyle, pelos conselhos, amizade, pelos cafezinhos e momentos de descontração no final da tarde.

À querida Érika Silveira, pela amizade, pelas palavras de apoio sempre que estava presente e ajuda na interpretação dos dados de PCR em tempo Real.

Aos estagiários Rafael, Laynhon, André, Eliane e Flávia por toda ajuda durante deste trabalho.

À amiga Ana Cristina, técnica do Laboratório de Microscopia da Embrapa, pelo apoio a qualquer hora do dia e pela grande ajuda na confecção das lâminas para hibridização in situ.

Aos colegas Elsa, Nicolau, Andréia, Giovanni e Aisy do LTG pela agradável convivência, pela troca de experiências e auxílio em alguns momentos da pesquisa.

À amiga Mônica, técnica do Laboratório de Histopatologia Vegetal do CENA pela amizade, aprendizado, companhia nos estudos, e principalmente pelo suporte na parte de microscopia. "Mônica sem você seria impossível realizar este trabalho".

Ao Laboratório de Microscopia da ESALQ (NAP/MEPA), em especial ao professor Kitajima, pelo apoio concedido na fotodocumentação dos trabalhos de microscopia desta tese.

À amiga Alice por todo apoio enquanto estive em Piracicaba.

As demais amigas e amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do CENA: Renata, Alessandra, Lili, Ana Paula, Janaína, Simone, Eveline, Vânia, Pedro, Renan, Fabiana, Júnior e Hérica pela convivência maravilhosa no laboratório e pelos momentos de lazer nas festinhas e nos cafezinhos! Em especial agradeço a Ale por ter me recebido em sua casa nos últimos dias de conclusão de trabalho.

À Marília, bibliotecária do CENA, pelas correções das referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica e aos funcionários Geraldo e Gabriel da informática, Neuda e Claudia da pós-graduação e a secretária Suzi pela atenção e suporte.

À amiga Fernanda Raush pela amizade e apoio nas idas e vindas de Brasília.

A todos os queridos irmãos e irmãs em Cristo pelas orações, amizade e palavras de apoio!

Às adoráveis amigas: Zélia, Raquel, Fernanda Berlando e Gerfânia pela companhia nos finais de semana em Brasília, cumplicidade, pelas orações, e por todos os momentos de alegria e também de tristeza compartilhados, fortalecendo dia a dia nossa amizade!

A amiga Mércia, ao Tiago e André, pela agradável convivência e momentos de alegria.

À banca examinadora pelo aceite do convite.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho!

Muito obrigada!

RESUMO

KOEHLER, A. D. **Reprodução em *Brachiaria* spp.: *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase) no desenvolvimento da antera, do ovário e na embriogênese.** 2010. 108 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Gramíneas do gênero *Brachiaria* apresenta importância econômica como forrageiras no Brasil. O melhoramento genético, entretanto, é restrito devido a diferenças de ploidia entre os genótipos e a reprodução por apomixia. A indução de haplóides e duplo-haploides pelo cultivo in vitro de anteras ou de micrósporos isolados é relatada em diversas espécies. Além da criação de novos genótipos linhagens duplo-haplóides podem ser utilizadas como ferramentas para o estudo de marcadores moleculares. Dentre os fatores essenciais para o sucesso da técnica está o estágio do desenvolvimento do micrósporo, sendo o estágio uninucleado, geralmente, o mais responsivo. Um dos objetivos deste trabalho foi contribuir para a definição de parâmetros para a cultura de haplóides em *Brachiaria*. Flores e anteras isoladas de *B. brizantha* (B105) em diferentes estádios de desenvolvimento foram processadas para microscopia de luz. Os eventos observados foram associados a marcadores morfológicos. Experimentos de cultura de anteras foram estabelecidos e estruturas semelhantes a calos ocorreram em pouco explantes. Secções histológicas revelaram a ocorrência de micrósporos com divisão simétrica, indicando um possível desvio da rota do micrósporo para a rota esporofítica. Genes definidos como marcadores de embriogênese como *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*), podem ser utilizados para identificar o potencial embriogênico de células ou grupo de células, possibilitando monitorar a resposta in vitro. Duas seqüências parciais de cDNA isoladas de *B. brizantha* apresentaram alta identidade com homólogos de *SERK1* e *SERK2* de monocotiledôneas. Análise filogenética confirmou a alta similaridade sugerindo serem os possíveis ortólogos de *SERK* em *Brachiaria*, sendo nomeados como *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2*. Clones parciais da seqüência genômica foram obtidos. Análise de *Southern blot* identificou duas cópias deste gene tanto na planta apomítica como na sexual. A análise da expressão de *BbrizSERK2* por RT-qPCR na planta apomítica e sexual e durante a embriogênese somática revelou que este gene não é específico de tecidos reprodutivos. Expressão diferencial de *BbrizSERK* entre ovários apomíticos e sexuais, especialmente durante a megasporogênese, foi observada por hibridização in situ. Detectou-se forte sinal na célula-mãe do megásporo em ovários sexuais e ausência de sinal em ovários apomíticos. Após a antese, a expressão na planta apomítica foi observada apenas na

região micropilar e proembriões. Na sexual, foi observada nas antípodas e aparato da oosfera. Em anteras o mesmo padrão de expressão foi observado entre a planta apomítica e sexual, com forte expressão no tapete e nas células-mãe do grão de pólen, o que sugere um importante papel deste gene na esporogênese em *Brachiaria*. Em calos embriogênicos forte sinal foi observado em massas proembriogênicas, em embriões globulares e também em embriões somáticos mais desenvolvidos, confirmando a função de *SERK* como marcador de embriogênese em *Brachiaria*. Em anteras cultivadas in vitro, forte sinal foi observado em micrósporos binucleados com divisão simétrica e em alguns micrósporos vacuolados. Experimentos futuros com genes desta família poderão contribuir para monitorar processos in vitro em *Brachiaria*, indicando células ou grupos de células com potencial embriogênico, ajudando na definição das melhores condições de cultivo para a embriogênese e também para o estudo da reprodução neste gênero.

Palavras-chave: Forrageiras. Melhoramento genético vegetal. Cultura de tecidos. Expressão gênica.

ABSTRACT

KOEHLER, A. D. **Reproduction in *Brachiaria* spp.: *SERK* (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE) in anther and ovary development and in embryogenesis.** 2010. 108 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Brachiaria, gramineae present economic importance as forage in Brazil. The genetic breeding, however, is restricted by differences in ploidy among the genotypes and the apomixis. The development of a haploid and double haploid production has been reported for several species. Besides the production of new genotypes the development of double haploid lineages may be used for studies with molecular markers. Among important factors for the success of haploid plant development relies on the microspore developmental stage, with the uninucleate stage being usually the most responsive. One of the objectives of this work was to contribute for the definition of parameters for the development of haploid cultures in *Brachiaria*. *B. brizantha* (B105) flowers and isolated anthers were collected in different stages of development and processed for light microscopy. The events observed were associated to morphological markers. Anther culture experiments were established and calli formation occurred to a few explants. Histological sections of anthers cultivated in vitro, however, revealed the occurrence of microspores with symmetrical divisions, indicating a possible alternative to the sporophytic route. Genes defined as markers of embryogenesis, such as *SERK* (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE), may be utilized to identify the embryogenic potential of cells, or cell clusters, in an attempt to monitor the in vitro response. Two partial sequences of cDna isolated from *B. brizantha* (B30) showed high identity of these two sequences to *SERK1* and *SERK2* homologs from monocots. The phylogenetic analysis confirmed high similarity with these genes, indicating that these sequences are possible orthologs of *SERK* in *Brachiaria*, hence these were named *BbrizSERK1* and *BbrizSERK2*. Partial clones of genomic sequences were obtained. *Southern blot* analysis suggested two copies of this gene in both apomictic and sexual *B. brizantha*. The expression analysis of *BbrizSERK2* by RT-qPCR revealed that this gene is not specific to reproductive tissues. Differential expression of *BbrizSERK* between apomictic and sexual ovaries, especially during megasporogenesis, was observed by in situ hybridization. A strong signal was detected in the megaspore mother cell in sexual ovaries, with absence in apomictic ovaries. After anthesis, the expression in the apomictic plant was observed only in the micropylar region and proembryos, however, in the sexual plant, the expression was observed in the antipodals and egg apparatus. In anthers, the same in situ pattern was observed in the apomictic and the sexual plant, with a strong

expression in the tapetum and the pollen grain mother cell, suggesting an important role of this gene in the sporogenesis in *Brachiaria*. In embryogenic calli, strong signal was observed in proembryogenic masses, globular embryos and somatic embryos in later stages of development, confirming the role of *SERK* as an embryogenic marker in *Brachiaria*. In cultivated anthers, a strong signal was observed in binuclear microspores with symmetric division and vacuolated microspores. Further studies with this gene family may contribute to monitoring the in vitro processes in vitro in *Brachiaria*, defining cells or cell clusters with an embryogenic potential, helping for the definition of culture conditions for embryogenesis and also for reproductive studies in this genus.

Keywords: Forage. Plant breeding. Tissue culture. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura	
Figura 1. Inflorescência de <i>Brachiaria decumbens</i>	19
Figura 2. Esquema da reprodução sexual e apospórica em <i>Brachiaria</i>	21
Capítulo 1	
Figura 1.1. Desenvolvimento da antera de <i>B. brizantha</i> . Estádios 1-4	41
Figura 1.2. Desenvolvimento da antera de <i>B. brizantha</i> . Estádios 5-10	43
Figura 1.3. Desenvolvimento da antera de <i>B. brizantha</i> . Estádios 11-12	44
Figura 1.4. Anteras in vitro de <i>B. decumbens</i> (D4)	45
Figura 1.5. Cultura in vitro de anteras de <i>B. brizantha</i> (B105) em meio ML1G1	46
1.6. Cultura in vitro de anteras de <i>B. brizantha</i> (B105) em meio YP	47
Figura 1.7. Secções transversais (A-J) e longitudinais (K-L) de anteras cultivadas in vitro de <i>B. brizantha</i> (B105) coradas com azul de toluidina ou submetidas ao teste histoquímico PAS	48
Capítulo 2	
Figura 2.1. Estádios de desenvolvimento da antera e pistilo de <i>B. brizantha</i> , coletados para o isolamento de RNA e hibridização in situ	58
Figura 2.2. Ilustração da estrutura geral de genes <i>SERK</i> e posição dos iniciadores degenerados utilizados na amplificação	61
Figura 2.3. Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos de BbrizSERK1 e BbrizSERK2 com homólogos de outras monocotiledôneas	75
Figura 2.4. Esquema comparativo dos domínios estruturais presentes nos fragmentos BbrizSERK1 e BbrizSERK2, com base no múltiplo alinhamento, em relação aos domínios estruturais da proteína <i>SERK</i>	77
Figura 2.5. Árvore filogenética de proteínas <i>SERK</i> com base nas seqüências parciais de aminoácidos deduzidas, utilizando-se o método Neighbor-Joining	78
Figura 2.6. Análise de <i>SERK</i> de <i>B. brizantha</i> por <i>Southern blot</i>	79
Figura 2.7. Quantificação da expressão relativa de <i>BbrizSERK2</i>	80
Figura 2.8. Localização de transcritos de <i>SERK</i> em secções de ovários de <i>B. brizantha</i> com sonda senso (a) e anti-senso (b-j)	81
Figura 2.9. Indução de calos embriogênicos em sementes maduras de <i>B. brizantha</i> (B30) e localização da expressão de <i>SERK</i> por hibridização in situ	82
Figura 2.10. Localização de transcritos em agregados celulares provenientes de células de <i>B. brizantha</i> em suspensão	84
Figura 2.11. Localização de transcritos de <i>SERK</i> em embriões somáticos de <i>B. brizantha</i> em meio de regeneração	85
Figura 2.12. Localização dos transcritos de <i>SERK</i> em secções de anteras de <i>B. brizantha</i>	86
Figura 2.13. Localização dos transcritos de <i>SERK</i> em anteras de <i>B. decumbens</i> cultivadas in vitro	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Caracterização morfo-anatômica dos estádios de desenvolvimento da antera de <i>B. brizantha</i> (B105).....	39
Tabela 2.1. Iniciadores degenerados utilizados para amplificação de <i>SERK</i> em cDNA de <i>Brachiaria</i> e sua respectiva localização na proteína	60
Tabela 2.2. Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR em tempo Real para análise da expressão de <i>SERK</i> em <i>B. brizantha</i>	67
Tabela 2.3. Comparação da sequência nucleotídica do contig 1, resultante da análise de clones de cDNA de ovários de <i>B. brizantha</i> (B30), amplificado com iniciadores degenerados com seqüências depositadas no banco de dados não-redundante (NR).....	73
Tabela 2.4. Comparação da sequência nucleotídica do contig 2, resultante da análise de clones de cDNA de ovários de <i>B. brizantha</i> (B30), amplificado com iniciadores degenerados, com seqüências depositadas no banco de dados não-redundante (NR).....	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO.....	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	
3.1 O gênero <i>Brachiaria</i> , distribuição e taxonomia.....	26
3.2 Importância econômica.....	26
3.3 Melhoramento genético de <i>Brachiaria</i>	27
3.4 Biologia floral.....	28
3.5 Reprodução em plantas.....	29
3.6 Reprodução sexual.....	29
3.7 Reprodução assexua por apomixia.....	30
3.8 Apomixia em <i>Brachiaria</i>	31
3.9 Interesse biotecnológico no estudo da apomixia.....	33
3.10 Abordagens biotecnológicas para o estudo da apomixia e melhoramento de <i>Brachiaria</i>	34
3.10.1 Embriogênese somática em <i>Brachiaria</i>	34
3.10.2 Haploidização através da cultura de anteras/micrósporos.....	35
3.10.2.1 Desenvolvimento da antera e grãos de pólen em plantas.....	35
3.10.2.2 Embriogênese a partir da cultura de anteras e micrósporos.....	36
3.10.2.3 Genes marcadores de embriogênese.....	37
3.10.2.4 Genes da família <i>SERK</i> no desenvolvimento de plantas.....	39
CAPÍTULO 1	
RESUMO.....	41
1. Introdução.....	42
2. Material e Métodos.....	43
2.1 Material Vegetal.....	43
2.2 Análise estrutural dos estádios de desenvolvimento da antera e de anteras cultivadas in vitro por microscopia de luz.....	43
2.3 Cultura de anteras, visando obtenção de haplóides.....	44
2.3.1 Efeito do pH e de diferentes combinações de reguladores de crescimento, utilizando o meio N6.....	45
2.3.2 Efeito do pré-tratamento (estresse osmótico).....	45
2.3.3 Efeito do pré-tratamento em meio N6 sem a adição de fonte de carbono.....	45
2.3.4 Utilização do meio ML1G1 (AHMADABADI; RUF; BOCK, 2007) em anteras de <i>Brachiaria B. brizantha</i> (B30 e B105).....	35
2.3.5 Efeito da fonte de carbono, caseína hidrolisada, extrato de levedura e água de coco.....	46
2.3.6 Utilização do meio YU-Pei (YP) (GENOVESI; COLLINS, 1992) na indução de calos em anteras de <i>Brachiaria</i>	46
3. Resultados.....	47
3.1 Desenvolvimento da antera e marcadores morfológicos.....	47
3.2. Cultura de anteras, visando obtenção de haplóides.....	55
4. Discussão.....	59
4.1 Desenvolvimento da antera e do grão de pólen.....	59
4.2 Cultura de anteras, visando a obtenção de haplóides.....	62
CAPÍTULO 2	
Resumo.....	64
1. Introdução.....	65
2. Objetivos.....	66
3. Material e Métodos.....	67
3.1 Material Vegetal.....	67
3.2 Clonagem da seqüência codificadora de <i>SERK</i> de <i>B. brizantha</i>	67
3.2.1 Coleta de ovários, anteras, flores hermafroditas, folhas, raízes, calos embriogênicos e agregados celulares embriogênicos para extração de RNA.....	67

3.2.2 Extração de RNA total de ovários, anteras e agregados celulares embriogênicos	68
3.2.3 Extração de RNA total de flores, folhas, raízes e calos.....	69
3.2.4 Tratamento com DNase e verificação da integridade do RNA.....	69
3.2.5 Síntese de cDNA fita simples	69
3.2.6 Amplificação da sequência codificadora de <i>SERK</i>	70
3.2.7 Experimentos de 5' e 3' RACE (<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>)	71
3.2.8 Purificação e clonagem dos fragmentos.....	72
3.2.9 Sequenciamento e análise das sequências	72
3.2.10 Construção da árvore filogenética	73
3.3 Clonagem da sequência genômica de <i>SERK</i> de <i>B. brizantha</i>	73
3.3.1 Extração de DNA genômico	73
3.3.2 Amplificação da sequência genômica de <i>SERK</i>	74
3.3.3 <i>Southern Blot</i>	75
3.3.3.1 Marcação da Sonda.....	75
3.3.3.2 Hibridização e detecção de sinal	75
3.4 Análise da expressão de <i>SERK</i> de <i>B. brizantha</i> por transcrição reversa seguida por análise quantitativa de PCR (RT-qPCR)	76
3.5 Análise da expressão dos genes <i>SERK</i> de <i>B. brizantha</i> por hibridização in situ ...	77
3.5.1 Coleta e preparo dos tecidos.....	77
3.5.2 Síntese da sonda marcada com digoxigenina.....	78
3.5.3 Verificação da concentração da sonda por eletroforese em gel de agarose e confirmação da marcação da sonda por <i>dot blot</i>	79
3.5.4 Reação de hibridização	80
3.5.5 Reação de pós-hibridização e detecção imunológica	80
3.5.6 Hibridização <i>in situ</i> do tipo “whole mount”	81
3.5.7 Histologia de agregados celulares para observação detalhada do desenvolvimento.....	81
4. Resultados.....	82
4.1 Clonagem da sequência codificadora de <i>SERK</i> de <i>Brachiaria brizantha</i>	82
4.1.1 Amplificação e clonagem das sequências.....	82
4.1.2 Análise da sequência nucleotídica de cDNA.....	82
4.1.3 Análise das sequências de aminoácidos deduzidas dos contig 1 e contig 2 de <i>B. brizantha</i>	84
4.2 Clonagem da sequência genômica de <i>SERK</i> de <i>Brachiaria brizantha</i>	88
4.2.1 Análise da sequência genômica	88
4.2.2 Determinação do número de cópias de <i>SERK</i> no genoma de <i>B. brizantha</i>	89
4.3 Expressão de <i>BbrizSERK2</i> em <i>B. brizantha</i> por PCR em tempo real	90
4.4 Localização da expressão de <i>SERK</i> de <i>Brachiaria brizantha</i> por hibridização in situ	90
5. DISCUSSÃO.....	98
CONCLUSÕES GERAIS.....	105
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Brachiaria*, pertencente à família Poaceae, reúne cerca de 100 espécies, sendo algumas de grande importância econômica como forrageiras, especialmente nos países tropicais (RENVOIZE; CLAYTON, KABUYE, 1996). Apesar da importância econômica, 80% das sementes comercializadas destas forrageiras tropicais são de apenas duas variedades, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk (ANDRADE, 2001).

O melhoramento de braquiária apresenta dificuldades, devido a diferenças de ploidia existentes nos diversos genótipos e pelo modo de reprodução assexual por apomixia, presente em plantas de diversas espécies, inviabilizando cruzamentos intra e interespecíficos (VALLE et al., 2004).

Deste modo, o desenvolvimento de um sistema que permita a obtenção de haplóides é, portanto, de grande interesse, pois possibilitaria ultrapassar essa barreira. A obtenção de plantas haplóides é relatada em diversas espécies pertencentes à família Poaceae como *Avena sativa* (KIVIHARJU; TAURIANEN, 1999), *Hordeum vulgare* (HOEKSTRA et al., 1996; LI; DEVAUX., 2003), *Triticum aestivum* (KANG; YANG; DECKARD, 2003; LI; DEVAUX, 2003), *Oryza sativa* (TREJO-TAPIA et al., 2002; ASADUZZAMAN et al., 2003) e *Zea mays* (OKUMUS, HASSAN; AHMAD, 2001). O sistema mais comumente utilizado na obtenção de haplóides é por meio do cultivo de anteras ou micrósporos isolados. Esse processo conhecido como androgênese ou embriogênese do grão de pólen (REYNOLDS, 1997) ocorre em resposta a estímulos diversos (DATTA, 2005) que resultam no desvio da rota de desenvolvimento do micrósporo para uma rota esporofítica (SANTOS; BODANESE-ZANETTINI, 2002). Em *Brachiaria*, nenhum protocolo de indução haplóide foi descrito até o momento. A indução de embriogênese somática por meio de outros tecidos, no entanto, está relatada na literatura, com resultados positivos (TOHME et al., 1996; LENIS-MANZANO, 1998; CABRAL et al., 2006; ISHIGAKI et al., 2009).

A embriogênese ainda necessita de maiores estudos para a definição do sinal que dá início a este processo. A identificação de genes marcadores de embriogênese somática em plantas-modelo abre a possibilidade de monitorar esse processo em plantas de interesse econômico, indicando quais os tipos celulares adquiriram competência embriogênica em resposta aos tratamentos e as melhores condições de cultivo. Em *Brachiaria* o uso de genes marcadores por meio da técnica de hibridização in situ permitiria examinar a viabilidade da cultura de diversos tipos de explantes, incluindo anteras e micrósporos. Um dos genes considerado como um marcador do início do processo embriogênico é o gene *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*), inicialmente isolado em *Daucus carota* e *Arabidopsis*

(SCHMIDT et al., 1997; HECHT et al., 2001) e atualmente, bastante estudado em outras espécies como parte da rota de transdução de sinais que dirige a embriogênese somática.

Em *Brachiaria* a ocorrência natural de dois tipos de embriogênese: sexual e apomítica, aliada a embriogênese somática induzida a partir de sementes, faz desse gênero um modelo interessante para estudos de desenvolvimento, possibilitando o estudo comparativo dos três tipos de embriogênese. O estudo do gene *SERK* poderá contribuir para o entendimento da reprodução e de processos de regeneração in vitro em *Brachiaria*.

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para o estudo da reprodução em *Brachiaria* e viabilizar a utilização de um sistema in vitro para a produção de haplóides. Busca-se a utilização de um gene marcador da embriogênese, gene *SERK*, descrito em outras espécies, para orientar o desenvolvimento de sistemas in vitro e investigar o seu papel na apomixia, pela avaliação de seu padrão de expressão durante os processos apomítico e sexual.

Para isto, os seguintes objetivos específicos foram elaborados:

- 1) Caracterizar estruturalmente e histoquimicamente o desenvolvimento da antera e micrósporos, em associação com marcadores morfológicos;
- 2) Induzir cultura de calos ou embriogênese somática direta a partir de anteras, contendo micrósporos uninucleados, visando à obtenção de haplóides;
- 3) Clonar e caracterizar membros da família *SERK* em *Brachiaria*;
- 4) Caracterizar o padrão de expressão temporal e espacial de genes desta família ao longo do desenvolvimento reprodutivo sexual e apomítico de *Brachiaria* e verificar o potencial deste gene para o monitoramento de processos morfogênicos in vitro.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gênero *Brachiaria*, distribuição e taxonomia

Espécies do gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb estão amplamente distribuídas em regiões tropicais dos hemisfério norte e sul, especialmente na África, seu maior centro de diversidade (RENVOIZE; CLAYTON, KABUYE, 1996; PARSONS, 1972 apud RAO; KERRIDGE; MACEDO, 1996). Neste continente foram coletadas as espécies atualmente cultivadas no Brasil (VALLE, 1990). O gênero *Brachiaria* encontra-se inserido na tribo Paniceae; subfamília Panicoideae e família Poaceae, entretanto os critérios taxonômicos utilizados, tanto em relação ao gênero quanto das espécies componentes não são ainda bem definidos (RENVOIZE; CLAYTON, KABUYE, 1996). Com base em estudos florísticos foi sugerida uma nova nomenclatura para algumas espécies, antes formalmente inseridas no gênero *Brachiaria*, incluindo-as no gênero *Urochloa* (GONZÁLEZ; MORTON, 2005). Esta nova sistemática tem sido utilizada em trabalhos recentes como forma de sinônimos para algumas espécies do gênero *Brachiaria*, sendo nomeadas *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. dictyoneura*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis*. Neste trabalho manteremos a nomenclatura *B. brizantha* e *B. decumbens*.

3.2 Importância econômica

A pecuária constitui um dos setores mais importantes da economia brasileira, com potencial para a geração emprego, renda e alimento para a sociedade. Dados do IBGE (2008) apontam o Brasil como o dono do maior rebanho comercial do mundo, com um efetivo de 202,287 milhões de cabeças. Esse mercado, sobretudo na produção de carne e leite, tem se tornado cada vez mais competitivo em relação a outros países, principalmente pela utilização do sistema de criação via pasto, que proporciona menores custos de produção (ARAÚJO; DEMINICIS; CAMPOS, 2008)

Estima-se que a área total de pastagens no Brasil seja superior a 200 milhões de hectares, sendo mais da metade constituída por gramíneas cultivadas (ARAÚJO; DEMINICIS; CAMPOS, 2008). Entre essas os capins do gênero *Brachiaria* são os mais utilizados, devendo-se isso principalmente à sua boa adaptação a diversos tipos de solos, (FISHER; KERRIDGE, 1996). A esta característica é atribuída à expansão da pecuária extensiva no cerrado brasileiro, que apresenta solos ácidos e, portanto de baixa fertilidade (RAO et al., 1996; SOUZA et al., 2006). Só nesta região de cerrado a

área plantada com essas forrageiras é de aproximadamente 43 milhões de hectares (KARIA et al., 2006). Além dos benefícios para a pecuária o cultivo da *Brachiaria* movimentou a indústria brasileira de sementes, colocando o Brasil como o maior produtor, consumidor e exportador de sementes de forrageiras tropicais (SOUZA et al., 2006).

Historicamente a introdução da *Brachiaria* como forrageira no Brasil se deu a partir da década de 60 (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006) com *B. decumbens* cv. Basilisk. Este cultivar apresentava características agrônômicas que atendiam às necessidades dos produtores da época, tornando-se a primeira forrageira, plantada em larga escala no país (FISHER; KERRIDGE, 1996). Posteriormente, em 1984, a espécie *B. brizantha* cv. Marandu foi lançada no mercado. Diferente de *B. decumbens*, *B. brizantha* apresenta tolerância à cigarrinha das pastagens, passando a ser a forrageira mais plantada no Brasil (KARIA et al., 2006).

3.3 Melhoramento genético de *Brachiaria*

Os programas de melhoramento genético de *Brachiaria* têm buscado encontrar soluções para limitações não resolvidas por manejo (VALLE et al., 2004). Entre os principais objetivos desses programas está o aumento da produtividade, resistência a pragas, aumento no teor protéico e redução de lignina. Em *Brachiaria* há predominância da apomixia, um modo de reprodução assexual por sementes, na qual a progênie resultante é idêntica à planta-mãe (MILES; MAASS; VALLE, 1996). Em geral as plantas apomíticas são poliplóides, enquanto as sexuais diplóides (VALLE; SAVIDAN, 1996). Em *Brachiaria*, a maioria dos cultivares comerciais é tetraplóide e apomítica. A única espécie, diplóide e sexual, economicamente importante é *B. ruziziensis* (MILES; MAASS; VALLE, 1996). As espécies *B. brizantha* e *B. decumbens* reúnem genótipos tetraplóides e diplóides. Entre as diferentes espécies do gênero o número haplóide de cromossomos pode variar entre seis ($n=6$) (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE 2006), sete ($n=7$) (VALLE; SAVIDAN, 1996) ou nove ($n = 9$) (MENDES-BONATO et al., 2002), sendo este o número mais comum na grande maioria das espécies.

A diferença de ploidia observada entre espécies deste gênero impossibilita os cruzamentos, gerando um baixo número de híbridos e alto grau de esterilidade (VALLE et al., 2004). Além disso, as plantas apomíticas só podem ser utilizadas como doadoras de pólen, já que o desenvolvimento do embrião nestas plantas ocorre independente de fertilização. Por muitos anos, os programas de melhoramento de *Brachiaria* se basearam apenas na seleção de genótipos elites (MILES et al., 1996;

ARAÚJO et al., 2008). Posteriormente, a utilização de uma planta sexual de *B. ruziziensis*, tetraploidizada artificialmente ($2n=4X$) com colchicina (GOBBE; SWENNE; LOUANT, 1981; LUTTS; NDIKUMANA; LOUANT, 1994) possibilitou cruzamentos interespecíficos com *B. brizantha* e *B. decumbens* apresentando mesmo nível de ploidia. Uma outra tetraplóide artificial por colchicina foi obtida a partir de um genótipo sexual de *B. brizantha* (PINHEIRO et al., 2000) e está sendo avaliada para uso no melhoramento. A visualização de sacos embrionários meióticos do tipo Polygonum confirmou a manutenção de sexualidade nestas plantas (ARAÚJO et al., 2005). Mais recentemente, um estudo do comportamento meiótico de progênies obtidas por autopolinização dessas plantas revelou, entretanto, alto índice de anormalidades meióticas nas progênies, e identificou apenas uma planta, a C48, como adequada para ser utilizada como progenitora (MENDES-BONATO et al., 2009). Híbridos intra-específicos de *B. humidicola* foram obtidos e estão sendo avaliados, visando identificar híbridos apomíticos candidatos a novos cultivares, e híbridos de reprodução sexual com potencial para serem utilizados como genitores em novos cruzamentos (VALLE; JANK; RESENDE, 2009).

3.4 Biologia floral

A inflorescência de *Brachiaria* é uma panícula que possui de 2 a 6 racemos (ALVES, 2000). Cada racemo sustenta uma série de espiguetas arranjadas em uma ou duas fileiras (NUNES, 1984). O número, forma, comprimento da espiguetas e outras características variam conforme a espécie (RENVOIZE; CLAYTON, KABUYE, 1996). Segundo Alves (2000) o cultivar Marandu de *B. brizantha* apresenta de 20 a 36 espiguetas (ALVES, 2000). Cada espiguetas agrega duas flores sendo uma hermafrodita e outra estaminada. As flores são simples na sua composição, sendo as hermafroditas reduzidas a duas lodículas, três estames e um pistilo (ALVES, 2007). A flor estaminada é formada por apenas três estames e é funcionalmente normal, sendo capaz de produzir e liberar grãos de pólen durante a antese (DUSI, 2001). Na maturidade, as anteras são amarelas e o estigma apresenta coloração vinácea brilhante (ALVES, 2000). Na região sudeste do Brasil, região onde fica localizada a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, local onde foram realizados a maioria dos experimentos desta tese, o período de floração inicia no final do mês de dezembro e permanece até meados do mês de junho. O principal fator que determina este período é o comprimento do dia, podendo variar nas diferentes regiões.

Figura 1 - Inflorescência de *Brachiaria decumbens*. a) parte de um racemo mostrando a disposição das espiguetas em antese. b) Espiguetas com as glumas e a lema removidas mostrando a flor hermafrodita à esquerda e a flor estaminada à direita (setas). c) órgãos reprodutivos da flor hermafrodita mostrando as três anteras e o pistilo ao centro (Fotos Dusi 2001, com autorização).

3.5 Reprodução em plantas

Tanto plantas superiores quanto inferiores apresentam um ciclo de vida que alterna, entre uma geração esporófitica dominante e outra gametófitica. Na fase reprodutiva o esporófito produz esporos ($2n$) que após divisão meiótica seguida de mitoses, dá origem aos gametófitos masculino e feminino. A redução do número de cromossomos pela meiose é extremamente importante na reprodução sexual, propiciando recombinação genética no momento da fusão dos gametas feminino e masculino, segregação e a liberação de variabilidade genética (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996). Em um grupo de angiospermas, entretanto, a formação dos gametófitos masculino e feminino não envolve a redução do número de cromossomos pela meiose e o desenvolvimento do embrião ocorre independente de fertilização, num processo conhecido como apomixia (NOGLER, 1984; HANNA; BASHAW, 1987; ASKER; JERLING, 1992).

3.6 Reprodução sexual

A reprodução sexual em plantas envolve três processos: desenvolvimento de gametófitos reduzidos, dupla fertilização e desenvolvimento do embrião (KOLTUNOW, 1993). O desenvolvimento do gametófito feminino, ou saco embrionário ocorre no interior do óvulo e é dividido em dois estágios: megasporogênese e megagametogênese. A megasporogênese tem início com a diferenciação da célula

mãe do megásporo (CMM) a partir da célula arqueosporial, localizada na camada subepidérmica do óvulo (KOLTUNOW, 1993; GRIMANELLI et al., 2001). Durante a megasporogênese, a CMM ($2n$) é envolvida por calose, β -1,3-glucan, e após duas divisões meióticas forma uma tétrade de megásporos reduzidos (n). Três deles degeneram e apenas um, localizado na porção chalazal sobrevive, sendo chamado de megásporo funcional. Na megagametogênese, o megásporo funcional sofre três mitoses sucessivas, produzindo um saco embrionário reduzido do tipo Polygonum constituído por: três antípodas, duas sinérgides, uma célula central com dois núcleos polares e oosfera (REISER; FISCHER, 1993). Antes da fertilização ocorre a fusão dos núcleos polares. A dupla fertilização do saco embrionário dá origem ao embrião e ao endosperma triploide, tecido nutritivo, com a função de nutrir o embrião até a germinação da semente (WEST; HARADA, 1993).

3.7 Reprodução assexual por apomixia

Na reprodução assexual por apomixia ocorre o desenvolvimento do embrião independente de fertilização, diretamente a partir de células do óvulo, produzindo uma progênie idêntica a planta-mãe (NOGLER, 1984; ASKER; JERLING, 1992; KOLTUNOW, 1993). Entre as angiospermas mais de 300 espécies pertencentes a 35 famílias foram descritas como apomíticas (HANNA; BASHAW, 1987). Segundo NOGLER (1984) existem duas formas de apomixia: a esporofítica, também conhecida como embrionia adventícia, e a gametofítica ou apomeiose. Na embrionia adventícia, os embriões apomíticos desenvolvem-se diretamente a partir de células somáticas do nucelo, paralelamente à reprodução sexual. A apomixia gametofítica, por sua vez, pode ocorrer por dois mecanismos distintos: diplosporia e aposporia, que diferem entre si, de acordo com a célula que dará origem ao saco embrionário. Na diplosporia a meiose é parcial ou ausente, resultando no desenvolvimento de um saco embrionário a partir da célula mãe do megásporo não reduzida, seguida do desenvolvimento autônomo do embrião a partir da oosfera. Na apomixia do tipo apospórica, sacos embrionários não reduzidos desenvolvem-se diretamente de células somáticas do nucelo, denominadas “iniciais apospóricas”. Essas se distinguem das demais células do nucelo pelo grande tamanho, citoplasma denso, núcleos e nucléolos proeminentes (NOGLER, 1984; KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003).

1996; DUSI, 2001). No entanto, ainda não foi comprovada a ocorrência da fertilização de sacos embrionários do tipo Polygonum em genótipos apomíticos de *Brachiaria*.

Em relação à herança da aposporia em *Brachiaria*, resultados de análises de uma população segregante do cruzamento *B. ruziziensis* tetraplóide artificial (sexual) e *B. brizantha* tetraplóide (apomítica) apontam para uma herança simples, com um único locus dominante determinando essa característica, com genótipos aaaa para indivíduos sexuais e Aaaa para tetraplóides apospóricos (BICKNELL, 2001; SHERWOOD, 2001) (PESSINO et al., 1997). Essa herança dominante, também descrita para espécies dos gêneros *Pennisetum*, *Panicum*, *Paspalum*, *Ranunculus* e *Hieracium* sugere que o desenvolvimento de sacos apospóricos e parternogênese co-segregam como um único locus dominante (OZIAS-AKINS; DIJK, 2007).

Em várias espécies genes candidatos a atuarem no processo da apomixia têm sido buscados (GRIMANELLI et al., 2001). Entre estes, genes relacionados a regulação da meiose, ou regulação epigenética tem sido investigados. Em vários trabalhos sugere-se que os eventos relacionados à apomixia ocorrem como consequência da desregulação ou supressão de genes envolvidos na reprodução sexual (OZIAS-AKINS; DIJK, 2007), ou a rearranjos da expressão de genes no tempo e espaço, dos programas que constituem a via sexual (GRIMANELLI et al., 2001). Em *Hieracium* verificou-se a conservação do padrão de expressão de genes relacionados com tecidos reprodutivos durante o desenvolvimento apomítico e sexual, assim como durante o desenvolvimento do embrião e endosperma, sugerindo que apomixia e sexualidade compartilham elementos regulatórios comuns (TUCKER et al., 2003). Um dos genes indicados como candidato à apomixia é *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*), identificado como um marcador da embriogênese somática e zigótica em cenoura (*Daucus carota*) e *Arabidopsis* (SCHMIDT et al., 1997; HECHT, 2001). Pela sua capacidade em conferir competência embriogênica, foi sugerido que a apomixia pode ser conferida pela expressão de genes desta família ou ainda de outras proteínas regulatórias que interagem com elas (SYNGENTA BIOTECHNOLOGY, PATENT DEPARTMENT, INC, 2002). Em função disto, o gene *AtSERK1* tem sido testado para indução da embrionia adventícia em espécies sexuais como *Arabidopsis*, pela expressão deste gene sob o controle de promotores específicos de óvulos (KANTAMA et al., 2006). De fato, a expressão diferencial deste gene durante os processos apomítico e sexual tem sido relatada em *Poa pratensis* (ALBERTINI et al., 2005) e *B. decumbens* (DUSI, 2001).

3.9 Interesse biotecnológico no estudo da apomixia

Uma das características da apomixia é a possibilidade de clonagem através de sementes (HANNA; BASHAW, 1987), o que desperta um grande interesse no estudo desse modo de reprodução. A descoberta dos fatores que governam essa característica permitiria a introdução da apomixia em outras culturas, cuja propagação clonal seja de interesse. Neste caso a apomixia traria como vantagens a fixação do vigor híbrido associado à propagação de sementes, simplificação na produção de sementes híbridas comerciais, simplificando também os programas de melhoramento genético, produzindo variedades bem adaptadas a diversos ambientes (VALLE et al., 2004). Em relação ao melhoramento de *Brachiaria* a compreensão desses mecanismos permitiria também a quebra da apomixia em cultivares economicamente importantes, possibilitando o cruzamento com outras espécies e a liberação de variabilidade genética.

3.10 Abordagens biotecnológicas para o estudo da apomixia e melhoramento de *Brachiaria*

3.10.1 Embriogênese somática em *Brachiaria*

Semelhante à apomixia, a embriogênese somática é também um modo de reprodução assexual, onde, através da manipulação *in vitro* em condições apropriadas, células somáticas ou gaméticas (micrósporos e óvulos não fertilizados) desenvolvem-se numa planta completa, passando por fases muito semelhantes às observadas na embriogênese zigótica (ZIMMERMAN, 1993, ARNOLD et al., 2002). As células que adquirem a capacidade para desenvolver embriões somáticos são denominadas células competentes. A competência embriogênica é conferida por diversos fatores, que resultam em modificações morfológicas e fisiológicas, que levam a mudanças no destino celular. Entretanto, tais modificações são pouco conhecidas. Os tratamentos utilizados para indução embriogênica variam conforme a espécie e fonte de explante. Em geral, os meios de cultura utilizados na fase de indução embriogênica utilizam altas concentrações de reguladores de crescimento, entre os quais o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é o mais utilizado. Tratamentos de estresse também são bastante utilizados (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003). Entretanto, a resposta dos tecidos aos tratamentos é muito variável, sendo altamente dependente do genótipo, do tipo de explante, estágio de desenvolvimento de tecidos, e dos níveis endógenos de hormônios (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; JIMÉNEZ, 2001; FEHÉR, 2008).

A embriogênese somática quando bem estabelecida pode ser utilizada como ferramenta biotecnológica para diversos fins como: propagação de culturas economicamente importantes e de difícil propagação clonal por técnicas convencionais; produção de plantas com diferentes níveis de ploidia, quando induzida a partir de micrósporos ou óvulos não fertilizados; fonte de explantes para transformação genética, além de servir aos estudos genéticos e moleculares da embriogênese.

Protocolos de indução de embriogênese somática têm sido descritos para várias espécies de gramíneas. Em *Brachiaria*, poucos trabalhos de regeneração via embriogênese somática estão disponíveis na literatura até o momento. Um método de indução de embriogênese somática utilizando embriões de sementes maduras como fonte de explantes foi desenvolvido (TOHME et al., 1996; LENIS-MANZANO, 1998). Posteriormente visando aumentar a eficiência da indução e regeneração de embriões

somáticos em *B. brizantha* SILVEIRA et al., 2003 testaram a utilização de dois meios de indução: o M1 contendo 2mg/L de 2,4-ácido diclorofenoxiacético e M1.2 com o dobro da concentração, sendo este mais efetivo no processo de indução. Na fase de regeneração os meios MS1 e MS2 foram testados, em relação à melhor concentração de ácido naftalenoacético (ANA) e cinetina no processo de regeneração, obtendo melhores resultados com o meio MS2. Um protocolo ainda mais otimizado foi descrito por Cabral et al. (2006) com o uso do meio de indução MSCLind (3mg/L de 2,4-D) para indução e crescimento de culturas de células em suspensão e MSCLreg, contendo benzilaminopurina (BAP), ANA e cinetina na regeneração. Recentemente um protocolo para indução de embriogênese somática utilizando meristemas apicais como fonte de explante foi relatado com sucesso para *B. ruziziensis* (ISHIGAKI et al., 2009).

3.10.2 Haploidização através da cultura de anteras/micrósporos

3.10.2.1 Desenvolvimento da antera e grãos de pólen em plantas

Em plantas, o desenvolvimento da antera é determinado por uma série de eventos mitóticos, meióticos e de diferenciação celular. Na primeira fase do desenvolvimento a morfologia da antera é estabelecida com a diferenciação de células e tecidos, constituintes da parede da antera e filete. Nesta fase as células-mãe do grão de pólen sofrem meiose originando tétrades de micrósporos (microsporogênese) nos sacos polínicos. A segunda fase é marcada pelo desenvolvimento dos grãos de pólen (microgametogênese), acompanhado do crescimento da antera, extensão do filete, e por fim a degeneração dos tecidos que levam a deiscência e liberação dos grãos de pólen (GOLDBERG; BEALS; SANDERS, 1993; SANDERS et al., 1999). Em *Arabidopsis thaliana* o desenvolvimento da antera e grão de pólen foram divididos em 14 estádios de acordo com os eventos citológicos observados desde a emergência do primórdio até a liberação do grão de pólen e senescência da antera (SANDERS et al., 1999).

Após a liberação da tétrade, o micrósporo jovem possui um grande núcleo central e pequenos vacúolos no citoplasma. No início da microgametogênese ocorre a polarização do núcleo, favorecida pelo surgimento de um grande vacúolo. O micrósporo sofre então uma divisão assimétrica, originando duas células: a célula vegetativa e a célula generativa. Essa divisão assimétrica é essencial para o desenvolvimento do gametófito masculino, estabelecendo a identidade desses dois tipos celulares no grão de pólen. Uma segunda divisão ocorre apenas na célula generativa, dando origem a duas células espermáticas, os gametas masculinos,

completando a rota gametofítica de desenvolvimento do micrósporo em grão de pólen (TANAKA, 1993; MARIATH ; SANTOS; BITTENCOURT, 2003).

3.10.2.2 Embriogênese a partir da cultura de anteras e micrósporos

Micrósporos e grãos de pólen imaturos podem ser induzidos a redirecionar a rota de desenvolvimento para um programa esporofítico e produzir embriões haplóides, capazes de regenerar uma planta haplóide (REYNOLDS, 1997; SANTOS; ZANETTINI, 2002). Essa capacidade foi observada pela primeira vez em *Datura innoxia* em 1960, durante estudos da fisiologia da meiose, nos quais anteras eram cultivadas in vitro. Desde então a cultura de anteras ou micrósporos isolados tem sido relatada em mais de 200 espécies economicamente importantes (MORAES-FERNANDES et al., 1999).

Vários são os fatores que podem afetar a eficiência do processo de produção e de regeneração de plantas haplóides, entre os quais, o genótipo e fisiologia da planta doadora de explantes, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos e as condições de cultivo (constituição do meio nutritivo, pH, temperatura e reguladores de crescimento (TREJO-TAPIA et al., 2002; DATTA, 2005). Em cereais como arroz, trigo, aveia e cevada fatores desencadeadores de estresse como baixas ou altas temperaturas, estresse osmótico e salino são considerados como essenciais no processo de androgênese, dependendo do genótipo (TOURAEV; VICENTE; HEBERLE-BORS 1997; XIE et al., 1997; KIVIHARJU; PEHU, 1998; GÚZMAN; ARIAS, 2000; TREJO-TAPIA et al., 2002). Em tritcale foi demonstrado que a indução de androgênese mediada por baixas temperaturas pode estar relacionada com aumento dos níveis de ABA e atividade de enzimas antioxidantes nos tecidos da antera, regulando positivamente a tolerância ao estresse causado pela falta de nutrientes e a resposta androgênica. Neste caso o tratamento a frio serviria como um fator anti-estresse (ZUR et al., 2008). Em arroz demonstrou-se, também, que a habilidade de resposta androgênica de anteras em cultura, pode variar dependendo da posição da espiguetas na inflorescência, na qual foram coletadas, estando isto relacionado à fase de desenvolvimento da antera e do micrósporo (AFZA et al., 2000). Os meios de cultura mais utilizados em cereais são o N6 (CHU, 1978) e o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), geralmente com modificações, variando-se fonte e concentração de açúcares, fonte de nitrogênio, tipo e concentração de reguladores de crescimento (DATTA, 2005). A otimização das condições de cultivo, entretanto, deve ser buscada para cada espécie em estudo.

A produção de haplóides é de grande aplicação no melhoramento genético. A fase posterior à regeneração das plantas é a duplicação dos cromossomos, sendo

necessária para restauração da fertilidade. A haploidização seguida de nova duplicação cromossômica produz plantas duplo-haplóides. Estas podem ser utilizadas como progenitoras em cruzamentos intra-específicos. Além disso, as linhagens duplo-haplóides são completamente homozigotas, podendo ser utilizadas em análises genéticas e pesquisas com marcadores moleculares. Além disso calos embriogênicos provenientes de micrósporos podem ainda ser utilizados como explantes para transformação genética (PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA et al., 1999). Em *Brachiaria*, na qual o melhoramento é limitado pela diferença de ploidia de plantas apomíticas e sexuais um protocolo para regeneração de haplóides e duplo-haplóides de *Brachiaria* representaria um avanço não apenas aos programas de melhoramento genético, como também no entendimento da relação poliploidia e reprodução apomítica.

3.10.2.3 Genes marcadores de embriogênese

A embriogênese somática tem sido relatada para um grande número de angiospermas e gimnospermas, e tem servido como ferramenta para estudos relacionados ao desenvolvimento do embrião em plantas (ZIMMERMAN, 1993). A compreensão dos mecanismos moleculares que promovem este processo tem avançado nos últimos anos (KARAMI; SAIDI, 2009).

Vários genes que codificam proteínas regulatórias ou atuantes na cascata de sinais que dirige as fases de indução e desenvolvimento de embriões somáticos têm sido identificados, e utilizados como marcadores da transição da fase vegetativa para a embriogênese. Entre as proteínas regulatórias estão fatores de transcrição, que controlam a expressão de genes requeridos para o desenvolvimento do embrião. Um desses genes é o BABY BOM (BBM), que codifica um fator de transcrição do tipo AP2/ERF. Esse gene foi identificado através de uma biblioteca subtrativa em cultura embriogênica induzida a partir de micrósporos em *Brassica napus*. A expressão constitutiva desse gene promoveu a indução espontânea de embriões somáticos e estruturas cotiledonares nesta espécie (BOUTILIER et al., 2002). Outro fator de transcrição é o AGL15 da família MADS-Box. Em *A. thaliana* estudos de expressão gênica demonstram acúmulo do produto desse gene em embriões somáticos, sugerindo que pode ser regulado por auxina (ZHU; PERRY, 2005). Em soja, verificou-se que a perda de função de AGL15 reduz a frequência de embriogênese somática, enquanto que a superexpressão aumentou a resposta embriogênica (THAKARE et al., 2008). Fatores de transcrição do tipo *homeobox*, entre eles o WUS e membros da família WOX também têm sido relacionados à indução embriogênica. Em plantas,

estes genes estão associados à regulação dos meristemas apical caulinar e floral (LAUX et al., 1996) e tem sido descritos como fundamentais na iniciação de culturas embriogênicas, assim como na embriogênese zigótica (HAECKER et al., 2004). Estudos recentes demonstram que genes desta classe são altamente regulados por gradientes de auxina (KISELEV; TCHERNODED, 2009; KISELEV; TURLENKO; ZHURAVLEV, 2009; PALOVAARA; HAKMAN, 2009; SU et al., 2009). Outros genes também relacionados à embriogênese são os da classe LEAFY COTILEDON (LEC), importantes no controle da embriogênese zigótica, especialmente na maturação do embrião. Mutações nesses genes resultaram em defeitos na identidade do embrião e no processo de maturação (MEINKE et al., 1994). O gene *LEC1* codifica a subunidade HAP3 de fatores de transcrição de ligação a CCAAT (KWONG et al., 2003). *LEC2* codifica o domínio B3, característico de vários fatores de transcrição (STONE et al., 2003). Em *A. thaliana* foi demonstrado que expressão ectópica de *LEC1* e *LEC2* aumenta a capacidade embriogênica em tecidos somáticos (LOTAN et al., 1998; STONE et al., 2003; KARAMI; AGHAVAISI; POUR, 2009). No híbrido *Heliantus annuus* x *H. tuberosum* observou-se que a superexpressão de genes desta classe e acúmulo de auxina também marcam competência embriogênica na cultura in vitro (CHIAPPETTA et al., 2009).

Dentre os genes envolvidos na rota de transdução de sinais que governam a embriogênese o mais estudado é *SERK* (*SOMATIC EMBRIOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*), caracterizado como marcador de embriogênese, pela sua expressão transiente nas fases iniciais da embriogênese somática e zigótica. O gene *SERK* foi isolado pela primeira vez através de um “screening” diferencial entre culturas embriogênicas e não embriogênicas de cenoura (*Daucus carota*) (SCHMIDT et al., 1997). Em *Dactylis glomerata*, da família Poaceae, a expressão deste gene foi observada no início da embriogênese somática, até o estágio globular, e posteriormente esteve presente também no meristema apical, escutelo, coleóptilo e coleorriza (SOMLEVA; SCHMIDT; DE VRIES, 2000). Em *A. thaliana* a expressão de *AtSERK1*, foi observada no megásporo funcional, em todas as células do saco embrionário e durante a embriogênese zigótica até a fase cordiforme. Além disso, plantas de *A. thaliana* superexpressando *AtSERK1* apresentaram maior eficiência na iniciação de culturas embriogênicas (HECHT et al., 2001). A expressão deste gene em diferentes explantes mediada pela presença de auxinas tem sido relatada em várias espécies, dentre as quais *Daucus carota*, *A. thaliana*, *Dactylis glomerata*, *Triticum aestivum*, *Ocotea catharinensis* e *Medicago truncatula* (SCHMIDT et al., 1997; HECHT et al., 2001; SOMLEVA; SCHMIDT; DE VRIES, 2000; SINGLA et al., 2008 e SANTA-

CATARINA et al., 2004; NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003). Em *T. aestivum* a expressão de *SERK* também foi associada à presença de cálcio (SINGLA et al., 2008).

3.10.2.4 Genes da família *SERK* no desenvolvimento de plantas

SERK faz parte de uma família multigênica de receptores de proteínas do tipo quinase (RLK- Receptor-like kinase), que compreendem proteínas integrais de membrana com três domínios característicos: um domínio extracelular, um domínio transmembranar e um domínio quinase. Estruturalmente, estas se diferem umas das outras pela presença de diferentes motivos no domínio extracelular e estão filogeneticamente relacionados a receptores quinases de animais (BECRAFT, 1998; SHIU; BLEECKER, 2001a; 2001b; BECRAFT, 2002). As proteínas *SERK* possuem uma organização bastante conservada. O domínio extracelular é constituído por um peptídeo sinal, seguido por um zíper de leucina, cinco repetições ricas em leucina (LRR) e uma região rica em prolina (SPP). A região SPP ocorre exclusivamente em proteínas *SERK*, servindo como uma marca para identificação destas proteínas. Regiões ricas em prolina são também características das extensinas, sugerindo ser uma possível região de interação com parede celular (SCHMIDT et al., 1997; HECHT et al., 2001). O motivo LRR está envolvido em interação proteína-proteína (KOBÉ; KAJAVA, 2001) e o domínio quinase intracelular catalisa a fosforilação de resíduos de serina e treonina de proteínas alvos, desencadeando uma cascata de transdução de sinais (HANKS, 2003).

Em *Arabidopsis* cinco membros da família *SERK* foram identificados (*AtSERK1* a *AtSERK5*) (ALBRECHT et al., 2005; ALBRECHT et al., 2008). Estudos recentes têm demonstrando que genes desta família apresentam um padrão de expressão complexo ao longo do desenvolvimento, estando presentes em diferentes rotas do desenvolvimento de plantas. O gene *AtSERK1*, presente na via de transdução de sinais da embriogênese é parálogo *AtSERK2*, ambos presentes no controle da esporogênese masculina pela especificação de células do tapete, possivelmente formando um complexo de sinalização (ALBRECHT et al., 2005; COLCOMBET et al., 2005). Em *Arabidopsis* também tem sido relatada a expressão de *AtSERK1* em células do procâmbio e células vasculares feixes vasculares imaturos em raiz, hipocótilos e inflorescências (KWAATAAL; de VRIES, 2007). *AtSERK3* também conhecido como *BR11-Associated Receptor Kinase 1 (BAK1)*, está envolvido na sinalização mediada por brassinosteróides (LI; CHORY, 1997; ALBRECHT et al., 2008), e recentemente também caracterizado como um regulador central da imunidade em plantas (HEESE et al., 2007). *AtSERK1* (KARLOVA et al., 2006) e *AtSERK4/ BKK1* também tem sido apresentados como integrantes da sinalização por brassinosteróides. Em *medicago*

truncatula a expressão de *SERK1* além de estar envolvida na embriogênese zigótica e somática e na formação de feixes vasculares, tem sido atribuída a formação de nódulos radiculares de fixação de nitrogênio, enfatizando a função deste gene em eventos de reprogramação celular (NOLAN; KURDYUKOV; ROSE, 2009). Genes desta família têm sido isolados e caracterizados em várias espécies, estando amplamente envolvidos no desenvolvimento.

CAPÍTULO 1

DESCRIÇÃO ANATÔMICA DO DESENVOLVIMENTO DA ANTERA, E CULTURA DE ANTERAS EM *Brachiaria* sp. VISANDO OBTENÇÃO DE HAPLÓIDES

RESUMO

Gramíneas do gênero *Brachiaria* têm sido utilizadas como forrageiras em diversos países tropicais, adquirindo grande importância econômica. A maioria das variedades comerciais é tetraplóide e apomíticas, dificultando o melhoramento. Neste sentido um protocolo para indução de haplóides de *Brachiaria* por meio da cultura de anteras ou micrósporos isolados é de grande interesse, pois possibilitaria a geração de novos genótipos com potencial para serem utilizados em cruzamentos intraespecíficos. Um dos fatores essenciais no sucesso desta técnica é a definição do melhor estágio de desenvolvimento do micrósporo. Desta forma, um conhecimento prévio sobre as etapas de microsporogênese e microgametogênese, bem como dos tecidos esporofíticos que compõe a antera torna-se fundamental. Esse conhecimento associado a marcadores morfológicos pode facilitar a escolha do melhor explante. Além disso, o conhecimento dos tecidos da antera é importante para identificação da origem dos calos ou embriões somáticos. Neste trabalho, o desenvolvimento da antera e grão de pólen foi analisado por meio de cortes histológicos, e associado a marcadores morfológicos como comprimento da espiguetta ou flor hermafrodita, comprimento e coloração da antera e a morfologia do pistilo. Com base nos eventos citológicos observados, o desenvolvimento da antera foi dividido em 13 estágios de desenvolvimento, desde o estabelecimento da simetria bilateral até a deiscência da antera. Visando o estabelecimento de um protocolo para indução de haplóides anteras de *B. brizantha* e *B. decumbens* foram inoculadas em diversas condições de cultivo, sendo testados diferentes meios de cultura, combinação e concentração de reguladores de crescimento, pH, estresse osmótico e de temperatura. Em todos os tratamentos foi observado que a formação de estruturas semelhantes a calos foi restrita a poucos explantes, não havendo continuidade no desenvolvimento dessas estruturas. A análise histológica de anteras cultivadas revelou a presença de micrósporos com divisão simétrica, descrito em outras espécies como um importante marcador da resposta androgênica. Os resultados deste trabalho é o primeiro passo na indução de androgênese em *Brachiaria*. Contudo, novos experimentos são ainda necessários, visando a otimização das condições de cultivo e permitindo ultrapassar esta fase.

1. INTRODUÇÃO

A cultura de anteras é uma técnica que tem sido utilizada em diversas culturas, visando a regeneração de plantas haplóides, e posteriormente duplo-haplóides, através do tratamento das plântulas regeneradas com colchicina. As linhagens duplo-haplóides obtidas podem servir para programas de melhoramento genético e também para o estudo de marcadores moleculares ligados a características de interesse (MORAES-FERNANDES et al., 1999; DATTA, 2005). Gramíneas do gênero *Brachiaria* têm ganhado grande importância econômica como forrageiras nas últimas décadas, especialmente nos países tropicais (RENVOIZE; CLAYTON, KABUYE, 1996). A diferença de ploidia entre espécies do gênero, associada à reprodução apomítica dificulta o melhoramento neste gênero. Os cultivares utilizados são na maioria tetraplóides ($2n=4x=36$) (VALLE et al., 2004). Além da geração de genótipos duplo-haplóides que poderiam ser utilizados no melhoramento, a redução de ploidia em cultivares tetraplóides e apomíticos, serviria ao estudo da apomixia, na compreensão da relação ploidia versus apomixia.

A androgênese, também conhecida como embriogênese do micrósporo, é o processo pelo qual micrósporos ou os grãos de pólen, sob condições controladas, são induzidos a formarem embriões haplóides. O princípio desta técnica parte do pressuposto de que em determinadas condições de cultivo o gametófito masculino pode ter sua rota de desenvolvimento redirecionada para uma rota esporofítica (REYNOLDS, 1997; SANTOS; SANTOS; ZANETTINI, 2002; MARASCHIN et al., 2005). A eficiência da androgênese pode ser afetada por fatores diversos como o genótipo e condições nutricionais da planta doadora, meios de cultura, condições de cultivo (DATTA, 2005) e por fatores desencadeadores de estresses (MARASCHIN et al., 2005).

Um dos fatores essenciais para o sucesso da técnica é obter o estágio de desenvolvimento do micrósporo mais apropriado para iniciação da cultura. Em muitas culturas o estágio uninucleado tem sido considerado o estágio mais responsivo à indução (PETERS et al., 1999). Em *Brachiaria*, apesar da grande potencialidade da androgênese para o melhoramento genético até o momento pouco tem sido feito para obtenção de haplóides por meio a cultura de anteras (Diva Dusi, comunicação pessoal). Em experimentos anteriores calos embriogênicos foram obtidos utilizando-se anteras no estágio 3, com base na morfologia do pistilo. Apesar disto esses resultados não foram repetidos. A definição dos parâmetros para viabilização de um sistema reproduzível ainda não foi obtida. Entre outras, há uma carência de informações básicas sobre o desenvolvimento reprodutivo masculino, tanto da microsporogênese,

como da microgametogênese, que podem contribuir para a definição desses parâmetros. Neste processo, a associação das fases de desenvolvimento do micrósporo com marcadores morfológicos presentes na flor pode facilitar na hora da escolha dos explantes. O conhecimento dos tecidos esporofíticos que compõe a antera é também importante para o estudo da ontogenia de calos e embriões produzidos, possibilitando identificar por meio de cortes histológicos se estes são provenientes de micrósporos ou dos tecidos somáticos da antera.

Os estádios de desenvolvimento do micrósporo e da antera em *B. decumbens* e *B. brizantha* foram correlacionados a morfologia do pistilo, sendo este um importante marcador morfológico para a definição da etapa de desenvolvimento da antera (DUSI; WILLESEN, 1999; DUSI, 2001; ALVES et al., 2000).

Visando contribuir para os estudos reprodutivos em *Brachiaria* e, especialmente para a androgênese, este trabalho teve como objetivo descrever desenvolvimento da antera e do micrósporo associando a marcadores morfológicos e estabelecer cultura de anteras, visando a obtenção de haplóides em *Brachiaria* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Os experimentos apresentados neste capítulo foram conduzidos no Laboratório de Reprodução Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e biotecnologia e no Laboratório de Histopatologia Vegetal do CENA/USP. As secções histológicas foram fotografadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA - ESALQ/USP). Como material vegetal foram utilizadas plantas cultivadas em canteiros experimentais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Acessos:

- *Brachiaria brizantha* BRA 00591, tetraplóide ($2n=4x=36$) (B30) e BRA 002747, diplóide sexual ($2n=2x=18$) (B105).
- *B. decumbens* BRA 000191, tetraplóide ($2n=4x=36$) (D4) e BRA 004430, diplóide sexual ($2n=2x=18$) (D58).

2.2 Análise estrutural dos estádios de desenvolvimento da antera e de anteras cultivadas in vitro por microscopia de luz

Racemos em diferentes estádios de desenvolvimento de *B. brizantha* sexual (B105) foram coletados no campo. Sob microscópio estereoscópico as amostras foram coletadas, conforme os estádios de desenvolvimento das espiguetas, para obtenção de anteras desde o estágio de primórdio, até o estágio no qual há grão de pólen

formado. Quando não era possível individualizar as anteras, espiguetas e flores hermafroditas inteiras foram coletadas.

Foram adotados os seguintes parâmetros morfológicos para caracterização dos estádios da antera: comprimento da espiguetas ou flor hermafrodita nos estádios mais jovens; e em anteras individualizadas foram anotados o comprimento e coloração sendo estes associados às características morfológicas do pistilo. Para medição, uma micro-escala ocular calibrada foi utilizada. Anteras em cultura de *B. brizantha* (B105), após 30 d de cultivo em meio N6 (CHU, 1978) sem reguladores de crescimento e com 45 e 75 d de cultivo no meio YP (GENOVESI; COLLINS, 1982) com diferentes combinações de reguladores de crescimento foram coletadas.

As amostras coletadas foram imediatamente fixadas (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, CaCl_2 0,001 M em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2), sendo submetidas a vácuo por 1 h e então mantidas por aproximadamente 36 h na mesma solução, a 4 °C. Em seguida as amostras foram desidratadas em série etílica (10 a 100%) e incluídas em resina metacrilato (Historesin, Leica) ou resina Spurr (SPURR, 1969). Cortes histológicos (5 μm) foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica) com a utilização de navalha de aço, e coradas com azul de toluidina 0,05% para análise estrutural (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e também submetidas ao teste histoquímico PAS "Periodic acid – Schiff" para identificação de polissacarídeos neutros (MAIA, 1979). As lâminas foram montadas em resina sintética Entellan® (MERK). A análise e documentação fotográfica foram feitas em microscópio óptico Zeiss Axioskop2 HBO 100 w/2.

2.3 Cultura de anteras, visando obtenção de haplóides

Racemos de *B. brizantha* (BRA B30 e BRA B105) e *B. decumbens* (BRA D4 e D58) foram coletados no campo e colocados imediatamente em água para evitar desidratação. No laboratório os racemos foram desinfestados superficialmente em solução de etanol 70% por 5 min, e em seguida imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial (2,5%), por 20 min, seguido por três lavagens em água destilada autoclavada, em condições assépticas.

Anteras isoladas de flores hermafroditas foram coletadas com auxílio de microscópio estereoscópico na capela de fluxo laminar e colocadas imediatamente no meio de cultura. Nesses experimentos, o estágio de desenvolvimento da antera foi definido com base na morfologia do pistilo (ARAÚJO et al., 2000, ALVES, 2000), sendo utilizado o estágio 3, no qual o pistilo encontra-se plumoso e branco. Foram testados diferentes meios de cultura e diferentes combinações de reguladores de

crescimento, pH e tratamentos de estresse. Em todos os experimentos foram utilizadas as mesmas condições de cultivo, ou seja, sala de crescimento sob regime de escuro e temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$. Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso, sendo cada placa uma repetição, com 50 anteras (3 placas por tratamento). Os seguintes experimentos foram realizados:

2.3.1 Efeito do pH e de diferentes combinações de reguladores de crescimento, utilizando o meio N6

Neste experimento o meio básico utilizado foi o N6 (Chu, 1978) líquido acrescido de vitaminas N6, sacarose (6%) e mio-inositol (100 mg L^{-1}). Com exceção do tratamento H0, todos os demais tratamentos foram acrescidos de $0,5 \text{ mg/L}$ de cinetina (KIN). Tratamentos:

- 1) H0 (N6 pH 5,8 e pH 4,0) - sem nenhum regulador de crescimento.
- 2) H1 (0 de 2,4-D/ 0 de IAA, pH 5,8 e pH 4,0)
- 3) H2 ($1,5 \text{ mg/L}$ de 2,4-D/ 0 de IAA, pH 5,8 e pH 4,0)
- 4) H3(0 de 2,4-D/ $1,5$ de IAA, pH 5,8 e pH 4,0)
- 5) H4 ($1,5 \text{ mg/L}$ de 2,4-D/ $1,5$ de IAA, pH 5,8 e pH 4,0).

2.3.2 Efeito do pré-tratamento (estresse osmótico)

Neste experimento as anteras foram pré-tratadas em meio osmótico líquido ($1,490 \text{ mg/L}$ de KCl, 110 mg/L de CaCl_2 , 120 mg/L de MgSO_4 , 140 mg/L de KH_2PO_4 , e 60 g/L de manitol, pH 7.0) durante 3 ou 7 d, e em seguida, transferidas para meio N6 líquido com 6% de sacarose, sem a adição de reguladores de crescimento (pH 4,0 e 5,8).

2.3.3 Efeito do pré-tratamento em meio N6 sem a adição de fonte de carbono

As anteras foram mantidas em meio N6 (macro, micronutrientes e vitaminas) líquido, em ausência de sacarose por 1, 3 e 7 d, seguidos da transferência para N6 líquido suplementado com 6% de sacarose, sem a adição de reguladores de crescimento, pH 5,8. Foram coletadas 150 anteras de *B. decumbens* por bloco.

2.3.4 Utilização do meio ML1G1 (AHMADABADI; RUF; BOCK, 2007) em anteras de *Brachiaria B. brizantha* (B30 e B105)

Este meio combina solução de macronutrientes do meio N6 e vitaminas KT (HORN et al., 1983) suplementado com glicina (2 mg/L), mio inositol (100 mg/L), prolina ($2,88 \text{ mg/L}$), MgCl_2 (650 mg/L), caseína hidrolisada (100 mg/L), nitrato de prata (800 mg/L), espermidina ($0,5 \text{ mM}$), $2,2 \text{ mg/L}$ de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) e 20 g/L de sacarose. Nesse experimento foram testados pH 4,0, ou 5,8. Este meio foi

testado na forma semi-sólida, líquida e sistema bifásico com meio sólido ao fundo da placa, dando sustentação às anteras e meio líquido superficialmente, em contato com as anteras.

2.3.5 Efeito da fonte de carbono, caseína hidrolisada, extrato de levedura e água de coco

Nesse experimento anteras de B105 foram utilizadas como explantes. Utilizou-se o meio N6 líquido, acrescido de vitaminas B5, 100 mg/L de mio inositol, maltose nas concentrações de 3 ou 6%, caseína hidrolisada (250 mg/L) e extrato de levedura (400 mg/L). Para as duas concentrações de maltose foram ainda testadas a presença de 2,5 mg /L de 2,4-D ou Picloran. Utilizando ainda esse mesmo meio de cultura, com maltose na concentração de 3 mg/L foi também testada a presença ou ausência 15% de água de coco no meio.

2.3.6 Utilização do meio YU-Pei (YP) (GENOVESI; COLLINS, 1992) sólido na indução de calos em anteras de *Brachiaria*

Esse meio foi desenvolvido para cultura de anteras de milho, e utiliza o regulador de crescimento TIBA (2,3,5-triodobenzoic acid) (0,2 μ M), uma antiauxina e carvão ativado. Esse experimento teve como objetivo testar esse meio de cultura em sua formula original, e também combinado com diferentes citocininas, como BAP, cinetina e TDZ, nas concentrações de 0,25; 0,5, 1 e 2,0 mg/L. Foram utilizados os seguintes tratamentos:

- 1) YP sem TIBA
- 2) YP com TIBA
- 3) YP + TIBA + 0,25 mg/L de BAP
- 4) YP + TIBA + 0,5 mg/L de BAP
- 5) YP + TIBA + 1,0 mg/L de BAP
- 6) YP + TIBA + 2,0 mg/L de BAP
- 7) YP + TIBA + 0,25 mg/L de Cinetina
- 8) YP + TIBA + 0,5 mg/L de Cinetina
- 9) YP + TIBA + 1,0 mg/L de Cinetina
- 10) YP + TIBA + 2,0 mg/L de Cinetina
- 11) YP + TIBA + 0,25 mg/L de TDZ
- 12) YP + TIBA + 0,5 mg/L de TDZ
- 13) YP + TIBA + 1,0 mg/L de TDZ
- 14) YP + TIBA + 2,0 mg/L de TDZ

Como explantes foram utilizadas anteras de B30 e B105, sendo inoculadas 20 anteras por placa, e três placas por tratamento. Um segundo experimento utilizando esse meio testou também a presença do 2,4-D na concentração de 2,5 mg/L, em pHs 4,0 e 5,8. Foram utilizadas 5 placas por tratamento, e 16 anteras por placa (B105).

Utilizando o YP como meio básico foi realizado um terceiro experimento, testando os efeitos do pré-tratamento a frio e calor, e a presença de TIBA e colchicina. Para esse fim, racemos de *B. brizantha* (B105) foram coletados no campo, embrulhados em papel alumínio e colocados a 4° C, na geladeira e em incubadora a 37 °C por 7 d. No sétimo dia os racemos foram desinfestados superficialmente e introduzidos em meio YP com os seguintes tratamentos:

- 1) YP pH 5,8
- 2) YP com colchicina 0,02%
- 3) YP com TIBA (0,2 µM)
- 4) YP com TIBA (0,2 µM) + colchicina 0,02%

Nos tratamentos com colchicina, as anteras eram mantidas nesse meio por apenas 3 dias e em seguida transferidas para o mesmo meio sem adição da mesma. Cinco placas foram utilizadas por tratamento, e 16 anteras por placa.

3. RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento da antera e marcadores morfológicos

O androceu de *Brachiaria* é composto por três estames na flor hermafrodita e três estames na flor masculina. A antera é biteca e tetralocular, dorsifixa, com deiscência longitudinal (VIDAL; VIDAL, 1992).

Secções transversais de anteras de *B. brizantha* B105 sexual foram obtidas para descrever as mudanças ocorridas na antera e grão de pólen ao longo do desenvolvimento, desde a fase pré-meiotica até a deiscência da antera. Neste trabalho o desenvolvimento de anteras de *Brachiaria* foi dividido em 13 estádios que representam eventos celulares visualizados por microscopia de luz. A Tabela 1 resume os principais eventos observados em cada estágio de desenvolvimento da antera, relacionando-os com as características morfológicas da espiguetas ou flor hermafrodita nos estádios mais jovens do pistilo.

No presente trabalho, o estágio 1 da antera corresponde aos eventos observados em cortes transversais de espiguetas em diferenciação, antes das flores estarem completamente fechadas pelas glumas, lemas e páleas. Esta fase representa o início do desenvolvimento da antera, quando já se observa externamente a

diferenciação das tecas. Neste estágio a simetria bilateral da antera já está estabelecida. A região do estômio já está formada, observando-se a epiderme (exotécio) bem definida, com células alongadas, apresentando planos de divisão anticlinal. A delimitação entre os lóculos e tecido conectivo, bem como das camadas de tecidos que constituem cada lóculo da antera não é ainda claramente definida. Abaixo da epiderme uma massa de células não diferenciadas, as células arqueosporiais, é observada (Figura 1.1a).

Para o estágio subsequente (estágio 2) secções transversais de espiguetas jovens com 2 mm de comprimento, contendo flor hermafrodita com anteras translúcidas, foram analisadas (Figura 1.1b). A morfologia da antera apresenta-se mais definida, com a delimitação entre lóculos e tecido conectivo (Figura 1.1c). A parede que compõe os lóculos, entretanto, não está completamente diferenciada, sendo possível distinguir apenas a epiderme com aspecto rendado e a cutícula espessa. Nas camadas subepidérmicas já é possível distinguir certo grau de diferenciação, sendo observadas a primeira e segunda camada parietal, apresentando plano de divisão periclinal e ao centro um grupo de células esporogênicas. Em todas as camadas as células apresentam citoplasma bastante denso, núcleos e nucléolos bastante evidentes.

No estágio 3 cortes histológicos da flor hermafrodita isolada com aproximadamente 0,5 mm foram analisados. Neste estágio a parede de cada lóculo é constituída por três camadas de células: epiderme, camada sub-epidérmica externa, precursora do endotécio e camada subepidérmica interna que dará origem ao tapete e camada média. Ao centro as células esporogênicas que se diferenciarão nas células-mãe do grão de pólen (CMP) (Figura 1.1d).

Tabela 1.1 – Caracterização morfo-anatômica dos estádios de desenvolvimento da antera de *B. brizantha* (B105).

Marcadores morfológicos			Eventos observados por microscopia	
Características da antera Estádio	Cor,tamanho	Característica da espiguetas, flor ou estádio do pistilo	Antera	Grão de pólen
1	Translúcida	Espiguetas com glumas, lemas e páleas em desenvolvimento.	Simetria bilateral, Es Ep, Ar	Ausente
2	Translúcida	Espiguetas jovens 1 a 2 mm	Delimitação dos lóculos e Cn. Ep, P1 e P2.	Ausente
3	Translúcida	Flor hermafrodita ~ 0,5 mm	Ep, CE, CI	Esp.
4	Verde claro	Flor hermafrodita ~ 1 mm. Pistilo no estádio 1	Ep, En, CM e T	CMP.
5	Amarela-translúcida, ~ 2 mm	Pistilo no estádio 2.	Ep, En, CM e T	Mp em divisão
6	Amarela clara, ~ 2,5 mm	Estádio 2 avançado do pistilo	Ep, En, CM e T	D, Te, Mp jovens uninucleados
7	Amarela, ~ 3 mm	Pistilo no final do estádio (2/3)) início da formação do estigma	Ep, En, CM, T	Mp uni, com pequenos vacúolos organizados na parede da antera
8	Amarela, ~ 3,5 mm	Início do estádio 3 do pistilo	Presença de Ep, En, e resquícios de tapete	Mp uni, com único vacúolo, polarização do núcleo, exina evidente
9	Amarela, ~ 4,0 mm	Estádio 3 (médio) do pistilo	Presença de Ep, En, e resquícios de tapete	Mp uni, com único vacúolo, polarização do núcleo, exina evidente
10	Amarela, ~ 4,0 mm	Pistilo com estigma bem plumoso, de coloração branco - brilhante	Presença de Ep, En, e resquícios de tapete	Mp uni, com único vacúolo, polarização do núcleo, exina evidente
11	Amarela, intumescida (parede delicada), ~ 5 mm	Pistilo no início do estádio 4, pistilo de coloração rosa	Ep., rompimento do septo, Antera bilocular	Acúmulo de substâncias de reserva. Pólen bi- e tri- nucleados, deposição da intina e formação do poro germinativo
12	Amarela, intumescida (parede delicada) ~ 5 mm	Pistilo no final do estádio 4, estigma de coloração vinho	Ep, rompimento do estômio	Grãos de pólen maduros
13	Murcha	Pistilo de coloração vinho escuro	Epiderme	Grãos de pólen liberados

Ar = células arqueosporiais, CE = camada subepidérmica externa, CI = camada subepidérmica interna, CM = camada média, Cn = conectivo, D = díade, En = endotécio, Ep. = epiderme, Es = estômio, Esp = células esporogênicas, Mp = micrósporo, P1 = primeira camada parietal, P2 = segunda camada parietal, T = tapete, Te = tétrade.

O estágio 4 da antera foi analisado a partir de cortes transversais da flor hermafrodita de aproximadamente 1 mm, e corresponde ao estágio 1 de desenvolvimento do pistilo (ARAÚJO, 2000). As anteras apresentam coloração verde claro. Nesta fase a parede dos lóculos está completamente desenvolvida, sendo constituída por quatro camadas de células: epiderme, endotécio, camada média e tapete. Ao centro de cada lóculo observa-se a presença de células mãe do grão de pólen, CMP, (Figuras 1.1e, f). Na figura 1.1f nota-se um espessamento da parede da CMP na região central do lóculo.

O estágio 5 da antera é correspondente ao início do estágio 2 do pistilo. As anteras são amarelo-translúcidas e com aproximadamente 2 mm de comprimento. Este estágio é marcado pela presença de meiócitos em divisão (Figura 1.2a). Durante o estágio 6 (final do estágio 2 do pistilo) as anteras com 2,5 mm de comprimento (amarelo claro) apresentam díades e tétrades ou micrósporos uninucleados jovens (Figuras 1.2b, c) apresentando núcleo central e nucléolos proeminentes. No estágio 7 as anteras são amarelas com aproximadamente 3 mm de comprimento e corresponde a pistilos no estágio 2 para 3. Nesse estágio os micrósporos uninucleados apresentam pequenos vacúolos distribuídos no citoplasma. Observa-se o início da degradação do tapete e a camada média já é quase imperceptível. Observa-se ainda, que os micrósporos estão organizados próximos à parede da antera (Figura 1.2d). No tecido conectivo as camadas de células são completamente diferenciadas, com um feixe vascular ao centro, envolvido pela epiderme, e duas a três camadas laterais de células parenquimáticas. Nos estádios de desenvolvimento de 8 a 10 (correspondente ao estágio 3 do pistilo) as anteras apresentam coloração amarelo forte medindo de 3,5 a 4 mm de comprimento. Na parede da antera observa-se a epiderme, endotécio e resquícios do tapete (Figura 2e). Nos micrósporos, organizados junto à parede da antera, observa-se a formação de um grande vacúolo, deixando o núcleo numa posição polarizada (Figura 1.2f). A exina torna-se mais evidente nos micrósporos (Figura 1.2f).

Figura 1.1 - Desenvolvimento da antera de *B. brizantha*. a) Início do desenvolvimento da antera: epiderme (Ep), as células arqueosporiais (Ar) e a região do estômio (Es). b) estágio 2 mostrando flor hermafrodita contendo três anteras (An) e um ovário (Ov). c) Estádio 2 mostrando tecido conectivo (Cn), epiderme (Ep) com cutícula (Ct), primeira e segunda camada parietal (P1, P2) e células esporogênicas (Esp). d) estágio 3 no qual se distingue epiderme, camadas subepidérmicas externa (CE) e interna (CI) e células esporogênicas (Esp). e) Estádio 4 apresentando parede da antera constituída por epiderme (Ep), endotécio (End), camada média (CM) e tapete (T). No centro as células-mãe do grão de pólen (CMP). f) estágio 4 mostrando espessamento da parede das CMPs na região central do lóculo (seta). Barras: a = 50 μ m, b = 100 μ m, c = 20 μ m, d = 20 μ m, e = 20 μ m, f = 50 μ m

Os estádios 11 e 12 equivalem ao estágio 4 do pistilo. As anteras apresentam coloração amarelo forte e atingem o comprimento final de aproximadamente 5 mm. A maturação do pólen é acompanhada por drásticas mudanças nos tecidos da antera, necessárias à deiscência da antera. Observa-se o rompimento do septo (Figura 1.3a). No micrósporo ocorre a deposição da intina, camada interna da parede do pólen (Figura 1.3b). Observam-se dois (Figura 1.3c) ou três núcleos (Figura 1.3d) correspondentes ao núcleo da célula vegetativa e um ou dois núcleos germinativos. O poro germinativo também é observado na parede do pólen (Figura 1.3e). Substâncias de reserva como grãos de amido foram observadas nos micrósporos (Figura 1.3f), e confirmadas pelo teste histoquímico PAS (dados não apresentados). Ao final do estágio 12 a antera torna-se bilocular (Figura 1.3g). No momento da deiscência da antera observa-se a abertura do estômio e os grãos de pólen maduros são finalmente liberados (Figura 1.3h). Na antese (estádio 13) a única camada da parede da antera que permanece é a epiderme, observando-se os sacos polínicos vazios, após a liberação dos grãos de pólen (Figura 1.3i).

Figura 1.2 - Desenvolvimento da antera de *B. brizantha*. a) Estádio 5 apresentando meiócitos em divisão (MC). b-c) estágio 6 apresentando díades (D) e tétrades (TE) e micrósporos jovens uninucleados (Mp). d) Estágio 7 apresentando micrósporos organizados próximos à parede da antera, início da degeneração do tapete (T) e camada média (CM) quase imperceptível. e-f) Estádios de 8-10 apresentando parede da antera constituída por epiderme (Ep), endotécio (En) e resquícios do tapete. f) Micrósporos uninucleados, com núcleo polarizado (n) e univacuolados (v) e presença da parede de exina (Ex). Barras: a = 25 μm , b-e = 50 μm , f = 20 μm

Figura 1.3 - Desenvolvimento da antera de *B. brizantha*. a-g) Estádios 11 e 12. a) apresentando o rompimento do septo (seta). b) deposição da parede de intina (seta). c e d) micrósporos apresentando 2 ou 3 núcleos, correspondentes à célula vegetativa (nV) e às células germinativas (nG). e) micrósporos apresentando o poro germinativo (P). f) micrósporos apresentando grãos de amido (seta). g) antera bilocular. h) rompimento do estômio (seta) e liberação de grãos de pólen maduro na antese. i) antera após a liberação do grão de pólen com sacos polínicos vazios. Barras: a = 200 μm , b = 20 μm , c = 20 μm , d = 12 μm , e = 25 μm , f = 20 μm , g = 120 μm , h – i = 200 μm .

3.2 Cultura de anteras, visando obtenção de haplóides

Anteras de *Brachiaria brizantha* (B30 e B105) e *Brachiaria decumbens* (D4 e D58) submetidas a diferentes tratamentos, visando a indução de calos ou embriogênese direta do micrósporo, apresentaram baixa frequência de explantes responsivos e uma avaliação descritiva destes resultados foi realizada. As respostas mais comumente observadas em todos os tratamentos foram: oxidação, intumescimento da antera, abertura da antera com liberação de micrósporos no meio de cultura, formação de grumos no interior da antera, e liberação de massas de micrósporos com aspecto leitoso, como apresentado na Figura 1.4.

Figura 1.4 - Anteras in vitro de *B. decumbens* (D4). a) Após cultura de em meio N6 (tratamento H1), Ph 5.8 mostrando anteras oxidadas. b) Após cultura no mesmo meio apresentando grumos no interior da antera. c-f) submetidas a tratamento osmótico em meio contendo sais e manitol pH 7,0, e em seguida transferidas para o meio N6 com sacarose 6%. c) anteras abertas expondo micrósporos após 3 d de tratamento osmótico, seguido de 15 d em meio N6 pH 4,0. d) anteras intumescidas após tratamento osmótico de 7 dias, seguido de 15 d em meio N6 pH 4,0. e) anteras abertas apresentando grumos de micrósporos e anteras oxidadas após 3 d de tratamento osmótico e 15 d em meio N6 pH 5,8. f) antera aberta apresentando pequenas estruturas semelhantes a calos após 4 d de tratamento osmótico e 15 dias de cultivo a) Barras: a) = 2 mm, b) = 0,5 mm

As condições de desinfestação e assepsia no momento da coleta das anteras foram corretamente determinadas, pois contaminação endógena ou resultante da manipulação foram observadas esporadicamente. Estruturas semelhantes a calos foram observadas em alguns tratamentos (Figura 1.5 e 1.6). Os meios de cultura que mais se destacaram em relação à formação de estruturas semelhantes a calos foram o N6 com ou sem adição de reguladores de crescimento, o ML1G1 líquido pH 4.0 e o YP. Entretanto, o número de estruturas era freqüentemente de um em 150 anteras normalmente inoculadas em cada tratamento. O crescimento destas estruturas, no entanto, ficou estacionado, não havendo continuidade em seu crescimento, mesmo quando renovado o meio de cultura.

Figura 1.5 – Cultura in vitro de anteras de *B. brizantha* (B105) em meio ML1G1a) estruturas semelhante a calos em antera após 30 d de cultivo em pH 4.0. b) antera apresentando a liberação de uma massa de micrósporo com aspecto leitoso. c) antera aberta expondo micrósporos com 3 d de tratamento em pH 4.0. d) antera apresentando estruturas semelhantes a calos após 30 d de cultivo em meio ML1G1 pH 5.8. e) antera intumescida com aparente formação de calo no centro. a) Barras: a) = 0,5 mm, b) = 0,2 mm, c) = 0,2 mm, d= 0,1 mm, e) 0,2 mm

Figura 1.6 – Cultura in vitro de anteras de *B. brizantha* (B105) em meio YP. a) estruturas semelhantes a calos em antera após 30 d no tratamento YP5. b) antera apresentando a liberação de massa de micrósporos com aspecto leitoso após 30 dias no tratamento YP6. c) antera intumescida e aberta expondo massa de micrósporos com aspecto leitoso em tratamento YP2. d-e) anteras apresentando estruturas semelhantes a calos após 30 d em tratamento Y13. a) Barras: a) = 0,5 mm, b) = 0,5 mm, c) = 0,5 mm, d= 0,1 mm, e) 0,2 mm

Anteras de B105 cultivadas no meio N6 com 6% de sacarose e no meio YP analisadas histologicamente evidenciaram tecidos e micrósporos com aspecto plasmolisados, desorganização do tecido conectivo, com divisões celulares nas células parenquimáticas, divisão assimétrica de alguns micrósporos e acúmulo de amido nos tecidos esporofíticos (Figura 1.7). Entretanto, evidências do início do processo de embriogênese foram também observadas com a presença de micrósporos com divisão simétrica. Além disso, em uma das anteras avaliadas foi observado o crescimento de uma massa de células no interior dos lóculos, indicando ser um possível início de calogênese.

Figura 1.7 – Secções transversais (A-J) e longitudinais (K-L) de anteras de *B. brizantha* (B105) coradas com azul de toluidina ou submetidas ao teste histoquímico PAS: A-E) anteras com 30 d em meio N6 apresentando A) micrósporos plasmolisados, B) divisões nas células parenquimáticas do tecido conectivo; C) Micrósporos em divisão assimétrica (setas), D-E), desorganização do tecido conectivo, acúmulo de amido (Am) e F) epiderme plasmolisada). G-J) anteras com 75 d de cultivo em meio YP apresentando micrósporos com divisão simétrica (setas), K-L) anteras com 45 d em meio YP apresentando o crescimento de massa de células semelhante a calo

4. DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento da antera e do grão de pólen

Na busca por genótipos promissores para o melhoramento genético de *Brachiaria* vários trabalhos relacionados a caracterização citogenética por meio do estudo da microsporogênese foram apresentados na última década, visando a identificação de acessos que produzam pólen viável (MENDES-BONATO et al., 2002, MENDES BONTATO et al., 2009; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006). No entanto, poucos trabalhos são encontrados enfatizando a ontogenia do grão de pólen.

Dusi e Willense (1999) desenvolveram um calendário reprodutivo para *B. decumbens* que associa as etapas de microsporogênese e microgametogênese com a morfologia do pistilo. Alves (2001) analisou as características citológicas do pólen de *B. brizantha* cv. Marandu em quatro estágios do desenvolvimento da antera, também em associação com os estádios do pistilo. Contudo até o momento nenhum trabalho visando à caracterização histológica do desenvolvimento da antera e do grão de pólen de *Brachiaria* está disponível na literatura. Em algumas famílias de angiospermas informações acerca da microsporogênese e do desenvolvimento do microsporângio (anteras) são de grande interesse taxonômico, delimitando ordens e famílias (MEDEIROS; MULLER, 1996).

A primeira parte deste estudo relata o desenvolvimento da antera e do grão de pólen de *B. brizantha*, relacionando com marcadores morfológicos como tamanho da espiguetas ou flor hermafrodita nos estádios iniciais, comprimento e coloração da antera e características do pistilo, este último segundo Araújo (2000). O desenvolvimento da antera em *Brachiaria* segue um padrão básico encontrado na grande maioria das angiospermas (GOLDBERG; BEALS; SANDERS, 1993). Neste trabalho o desenvolvimento da antera de *Brachiaria* foi dividido em 13 estádios, desde o estabelecimento da simetria bilateral da antera até a deiscência com a liberação dos grãos de pólen maduro. A epiderme é a primeira camada de células a se diferenciar na parede da antera, como resultado de divisões anticlinais da camada L1 do meristema floral (HUALA; SUSSEX, 1993), sendo o único tecido diferenciado, observado no estágio 1. Abaixo da epiderme encontram-se as células arqueosporiais, derivadas da camada L2 do meristema floral que, através de um coordenado programa de divisões celulares, originam as camadas de células que constituem a parede dos lóculos da antera e as células esporogênicas que se diferenciarão em células-mãe de pólen

(CMP) (GOLDBERG; BEALS; SANDERS, 1993; SANDERS et al., 1999). Divisões periclinais das células arqueosporiais originam as duas camadas subepidérmicas (interna e externa) que se diferenciarão nos tecidos maduros adjacentes a epiderme: endotécio, camada média e tapete. Em monocotiledôneas a camada subepidérmica externa se diferencia em endotécio, enquanto a camada interna, por divisão periclinal, origina a camada média e tapete. Nas dicotiledôneas divisões na camada subepidérmica externa dão origem ao endotécio e camada média, enquanto a camada interna dá origem apenas ao tapete (WILLENSE, 1992; DUVALL, 2001).

A função de cada uma destas camadas tem sido discutida por vários autores, e alterações nesse padrão de desenvolvimento podem ter conseqüências na redução de fertilidade ou mesmo na esterilidade masculina (KAUL, 1988; BÜYÜKKARTAL; ÇÖLGEÇEN; MARASALI, 2005). O tapete é um tecido especializado com a função de nutrir os micrósporos em desenvolvimento, contribuindo também na síntese de precursores da exina, a camada externa da parede do pólen (WILLENSE, 1992). Estudos com mutantes mostram que falhas na especificação do tapete por mutações de genes envolvidos no desenvolvimento desta camada podem levar à esterilidade masculina (ALBRECHT et al., 2005; COLCOMBERT et al., 2005). Entre as angiospermas são observados dois tipos de tapete: o secretor e o plasmodial. O tapete secretor ou celular é formado por células persistentes, enquanto o plasmodial é degenerado durante o desenvolvimento do grão de pólen (BARNES; BLACKMORE, 1992). Em *B. brizantha* o tapete é do tipo plasmodial e a degeneração deste tecido tem início após a liberação dos micrósporos da tétrade tapete, quando os micrósporos estão organizados próximo à parede da antera, persistindo até o estágio 10 da antera. No mutante natural *Photoperiod-sensitive genic male-sterile* (PSGMS) de arroz foi observado que a degeneração prematura do tapete, na fase pré-meiótica, é a principal causa de aborto de pólen, enfatizando a função deste tecido na regulação do desenvolvimento do pólen. Às demais camadas da parede, endotécio e camada média são atribuídas a função de armazenamento de substâncias de reserva, especialmente água, amido e proteínas. O endotécio também auxilia na abertura da antera (WILLENSE, 1992).

Eventos relacionados a megasporogênese são observados no início do estágio 4. Antes da meiose é observado um espessamento da parede celular da CMP. Esse espessamento coincide com a deposição de calose, ocorrendo momentos antes a meiose. Dusi e Willense (1999) verificaram que a deposição de calose em *B. decumbens* ocorre primeiramente na parede longitudinal interna da CMP e em seguida o meiócito é completamente envolvido por calose. A parede de calose é observada também em díades e tétrades. A liberação dos micrósporos da tétrade envolve a

participação da enzima calase, uma β -1,3 glucanase sintetizada no tapete e liberada no lóculo da antera (CHASAN, 1992). Neste trabalho a liberação dos micrósporos da tétrade foi observada no estágio 6, indicando o final da fase de megasporogênese neste estágio. Estudos recentes demonstram que a parede de calose nos micrósporos pode ser importante para a formação da exina e em tabaco foi demonstrado que a dissolução prematura desta pode também interferir na viabilidade do pólen (WORRALL et al., 1992).

Um aspecto do desenvolvimento do pólen a se destacar é a permanência da fase uninucleada do estágio 6 ao 10, sendo o período mais longo do desenvolvimento, embora outros eventos sejam observados neste período, uma informação importante na seleção de explantes para cultura de anteras. A megagametogênese tem início no estágio 7, sendo observada a polarização do núcleo, favorecida pela formação do vacúolo, deposição de substâncias de reserva e presença de núcleos assimétricos. Grãos de amido foram detectados nos estádios finais do desenvolvimento do pólen, antes da primeira divisão e em grãos de pólen maduros. A presença de outras substâncias de reserva no pólen de *B. brizantha* (B30) foi relatada por Alves (2000), sendo observados grânulos de lipídeos, além do amido. Estruturas semelhantes a grânulos de lipídeos foram também observados neste trabalho, mas para sua confirmação é necessária a realização de testes específicos. Esses eventos são ainda acompanhados pela formação das paredes da exina, intina e formação do poro germinativo. Antes da antese ocorre a segunda divisão mitótica nas células germinativas produzindo pólen trinucleado. Nos tecidos esporofíticos da antera a antese é precedida pelo rompimento do septum, deixando a antera bilocular, e abertura do estômio para liberação dos grãos de pólen maduros. O processo de deiscência da antera foi estudado em tomate (*Lycopersicum esculentum*). Este estudo mostrou que o rompimento do septum pode estar associado ao acúmulo de cristais de oxalato de cálcio nesta região, e sugere que altos níveis de oxalato de cálcio levam a ativação de enzimas hidrolíticas, responsáveis pela degradação da parede celular e protoplastos (BONNER; DICKINSON, 1989)

4.2 Cultura de anteras, visando a obtenção de haplóides

Foi observado no desenvolvimento dos micrósporos em *B. brizantha* que a fase de micrósporo uninucleado é a mais longa do desenvolvimento, passando por mudanças que antecedem a divisão assimétrica como formação de um grande vacúolo, polarização do núcleo e formação da parede de exina. Na grande maioria de espécies estudadas este mesmo estágio uninucleado tem sido reportado como o mais responsivo (PETERS et al., 1999; REYNOLDS, 1997; DATTA, 2005), seja em cultura de cultura ou de micrósporos isolados. Desse modo em *B. brizantha* a fase mais promissora para indução androgênese se daria dos estádios 6 ao 10 em que o comprimento da antera encontra-se entre 2,5 e 4 mm, coloração amarelo claro a forte, e morfologia do pistilo variando do estágio 2 avançado ao final do estágio 3, quando o pistilo encontra-se bem plumoso e branco brilhante. Em *Zea mays* e *Brassica napus* o comprimento da antera foi considerado como o melhor parâmetro para prever o estágio do micrósporo (KOTT; POLSONI; BEVERSDORF, 1987; MORAES et al., 2008). Segundo Moraes et al. (2008), em milho outro parâmetro, como o comprimento da espiguetas, não é considerado um bom marcador morfológico para o estágio do micrósporo, sendo bastante influenciado por mudanças ambientais. Até o momento a morfologia do pistilo tem sido o parâmetro utilizado para isolar anteras de mesmo estágio de desenvolvimento em *Brachiaria*. Nos experimentos mencionados neste trabalho o estágio de desenvolvimento do pistilo utilizado, foi o estágio 3, quando este encontra-se branco e plumoso. Os resultados deste trabalho confirmam nesse estágio a presença de micrósporos uninucleados em estágio avançado: com núcleos polarizados, univacuolados e com a parede de exina evidente. Esse estudo vai auxiliar na coleta do melhor estágio de desenvolvimento para a cultura de anteras, favorecendo no ajuste da metodologia para indução de haplóides via micrósporo.

Neste trabalho outros fatores como: várias combinações de reguladores de crescimento, fatores de estresses, presença de substâncias complexas como água de coco, a presença da antiauxina TIBA e colchicina foram testados. A ausência de resposta da maioria das anteras aos tratamentos indica que nas condições experimentais deste trabalho a presença de auxinas e citocininas, assim como dos demais tratamentos aplicados não foram suficientes para indução de calos. Do mesmo modo ela pode estar associada ao estágio das anteras escolhido para os experimentos. Estruturas semelhantes a calos foram restritas a algumas anteras. Os meios de cultura que mais apresentaram a formação dessas estruturas foram o ML1G1 (AHAMADABADI et al., 2007) e YU-PEI (GENOVESI; COLLINS, 1992) desenvolvidos para indução de calos a partir de folhas e micrósporos em milho.

Cortes histológicos de algumas anteras em cultura mostraram a ocorrência de micrósporos binucleados com divisão simétrica e sugerem uma possível alteração na rota de desenvolvimento desses micrósporos para um programa esporofítico e por algum motivo desconhecido não há continuidade na divisão destas células. Esse tipo de divisão é comum no início da androgênese de espécies como *Glycine max* (KALTCHUK-SANTOS et al., 1997), *Olea europaeae* L. (SOLÍS et al., 2008) e *Hordeum vulgare* (PULIDO et al., 2005). No entanto, ressalta-se que em outras espécies incluindo *G. max*, *Nicotiana tabacum*, *Hordeum vulgare* e *Triticum aestivum* a androgênese pode também iniciar a partir de uma divisão assimétrica, com a célula vegetativa ou degenerativa dando início ao processo de desenvolvimento (SANTOS; ZANETTINI, 2002). No sistema de androgênese de *G. max* e *Zea mays* foram observadas diferentes rotas de desenvolvimento. Por esse motivo em *Brachiaria* análises histológicas podem favorecer na determinação de um protocolo de androgênese, devendo-se estar atento a qualquer mudança no desenvolvimento do micrósporo. Além disso, outros marcadores da reprogramação do micrósporo devem ser consideradas como a ausência de amido, aumento do número de ribossomos e alterações na composição da parede celular (SOLÍS et al., 2008).

Uma outra ferramenta a ser explorada está na utilização de genes marcadores de embriogênese. O uso de genes como *SERK* por meio da hibridização in situ poderiam confirmar se a iniciação da embriogênese tem ocorrido nos tratamentos, e auxiliar na seleção da melhor condição de cultivo para a continuidade do processo.

CAPÍTULO 2

CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES *SERK* DE *Brachiaria brizantha*

Resumo

No presente trabalho, dois clones contendo a seqüência codificadora de genes *SERK* foram isolados a partir de cDNA de ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual. A análise dessas seqüências mostrou alta similaridade com *SERK1* e *SERK2* de outras monocotiledôneas como milho, cana e sorgo, indicando ser os possíveis ortólogos de *SERK* em *B. brizantha*, sendo por isso nomeados *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2*. Análises por PCR em Tempo Real (RT-qPCR) de *BbrizSERK2* demonstraram expressão em todos os órgãos analisados, sem especificidade para órgãos reprodutivos. Estudos de expressão em ovário por hibridização in situ mostraram um padrão de expressão diferencial entre o modo apomítico e sexual. Durante a megasporogênese, em ovários sexuais, expressão alta foi observada na célula-mãe do megásporo (CMM), no nucelo e em níveis mais baixos nos megásporos em degeneração. Não foi observada expressão em sacos embrionários maduros antes da antese. Após a antese a expressão foi verificada nas antípodas e aparato da oosfera. Em sacos apospóricos, não foi observada expressão durante a megasporogênese indicando diferenças antes da meiose no controle da regulação de *SERK* ou de genes relacionados. Após a antese a expressão foi observada apenas no proembrião. Em anteras, o padrão de expressão em plantas apomíticas e sexuais foi similar, expressando-se no tapete e nas células-mãe dos grãos-de-pólen (CMP) até que elas estejam envolvidas por calose, ficando restrita às células do tapete até a completa degeneração desse tecido. A expressão de *SERK* na CMM e na CMP sugere seu envolvimento na esporogênese de *Brachiaria* de forma geral. A expressão de *SERK* em culturas embriogênicas de *B. brizantha* provenientes de sementes maduras confirmou a função atribuída em outros sistemas como marcador da competência embriogênica. Assim, *SERK* poderá ser utilizado como ferramenta molecular, em forma de sonda, para monitorar outros sistemas in vitro de *Brachiaria* como a cultura de anteras, visando à indução de haplóides.

1. INTRODUÇÃO

Genes marcadores do processo de embriogênese somática vêm sendo caracterizados em diversas espécies e utilizados para monitorar processos de desenvolvimento *in vitro*, visando identificar células com capacidade embriogênica e não embriogênicas em determinadas condições de cultivo. Entre esses, o gene *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*), que codifica um receptor de proteína quinase do tipo LRR (Leucine Rich Repeat), foi descrito como um componente da via de transdução de sinais que dirige a embriogênese somática e zigótica. Esse gene foi inicialmente clonado por “screening” diferencial entre culturas embriogênicas e não embriogênicas de cenoura (*Daucus carota*), recebendo esse nome devido a sua expressão transiente nas fases iniciais da embriogênese somática, marcando células com características potencialmente embriogênicas até o estágio globular de desenvolvimento do embrião (SCHMIDT et al., 1997). Em *Dactylis glomerata*, da família *Poaceae*, a expressão de *SERK* foi também observada no início da embriogênese somática, até o estágio globular, e posteriormente foi observado também no meristema apical, escutelo, coleótilo e coleorriza (SOMLEVA et al., 2000).

Em *Arabidopsis thaliana*, a expressão de *AtSERK1*, foi observada nas fases iniciais da embriogênese zigótica, desde a oosfera fertilizada até o estágio cordiforme do embrião, e durante o desenvolvimento do óvulo, no megásporo funcional e em todas as células do saco embrionário. Além disso, a superexpressão de *AtSERK1* aumentou a eficiência na iniciação de culturas embriogênicas (HECHT et al., 2001). Mudanças no padrão de expressão de *SERK* em vários tecidos em meio de indução embriogênica têm sido demonstradas em diferentes espécies como *Zea mays* (BAUDINO et al., 2001), *Medicago trunculata* (NOLAN; IRWANTO; ROSE, 2003), *Heliantus annuus* (THOMAS et al., 2004), *Citrus unshiu* (SHIMADA et al., 2005), *Teobroma cacao* (SANTOS et al., 2005), *Cocos nucifera* (PÉREZ-NÚÑEZ et al., 2008), *Vitis vinifera* (SCHELLENBAUM et al., 2008), *Panax ginseng* (KISELEV; TCHERNODED, 2009), *Araucária angustifolia* (STEINER, 2009), entre outras, demonstrando a possibilidade de utilização desse gene como marcador de embriogênese somática.

Em *Arabidopsis* cinco genes da família *SERK* foram identificados (HECHT et al., 2001). Trabalhos recentes demonstram que esses genes apresentam um complexo padrão de expressão ao longo do desenvolvimento, estando presentes em outras vias de transdução de sinais, além da embriogênese, como no controle da esporogênese masculina (ALBRECHT et al., 2005; COLCOMBET et al., 2005; BAUDINO et al., 2001), na organogênese *in vitro* (THOMAS et al., 2004a; SHIMADA et

al., 2005; NOLAN et al., 2003; NOLAN et al., 2009), na sinalização mediada por brassinoesteróides (LI et al., 2002; ALBRECHT et al., 2008) e regulação de imunidade em plantas (HEESE et al., 2007). Experimentos de interação de proteínas e estudos com mutantes em *Arabidopsis* demonstram que membros dessa família formam complexos de sinalização com outras proteínas e podem interagir com membros da mesma família, com outras proteínas quinases e possivelmente com fatores de transcrição do tipo MADS-box, envolvidos no desenvolvimento floral, participando ativamente em vários processos de desenvolvimento (ALBRECHT et al., 2005; KARLOVA et al., 2006; ALBRECHT et al., 2008).

A associação com competência embriogênica levou a hipótese de que a apomixia pode ser conferida pela expressão destes genes ou de genes relacionados (SYNGENTA BIOTECHNOLOGY, PATENT DEPARTMENT, INC, 2002). Em *Poa pratensis* apomítica, a expressão de *PpSERK* em células nucelares sugeriu que estes podem estar envolvidos no desenvolvimento de sacos embrionários apospóricos (ALBERTINI et al., 2005). Em *Brachiaria decumbens*, a expressão de *AtSERK1* foi detectada na oosfera de plantas apomíticas antes da antese em ambos os processos reprodutivos, apomítico e sexual e após a antese em todas as células do saco embrionário (DUSI, 2001). A indução de embriões adventícia em *Arabidopsis* através da expressão de *AtSERK1*, dirigida por promotores específicos de óvulos foi testada, porém sem sucesso (KANTAMA et al., 2006).

Como apresentado no Capítulo 1, a cultura de anteras de espécies de *Brachiaria*, com a finalidade de obtenção de haplóides, mostrou-se extremamente recalcitrante. A análise por microscopia de luz de anteras cultivadas in vitro, entretanto, revelou a ocorrência de micrósporos binucleados com divisão simétrica, indicando que, possivelmente, alguns micrósporos têm a sua rota de desenvolvimento alterada para uma rota esporofítica. Porém, não há continuidade no desenvolvimento dos embriões. A utilização de um gene marcador de embriogênese, como *SERK*, por meio da técnica de hibridização in situ nessas culturas, permitiria a seleção de células induzidas, com capacidade embriogênica, e indicaria as melhores condições de cultivo.

Um sistema de embriogênese somática utilizando sementes de *B. brizantha* como fonte de explante vem sendo otimizado (TOHME et al., 1996; LENIS-MANZANO, 1998; CABRAL et al., 2007). A possibilidade de indução in vitro de embriogênese somática, aliada à existência de genótipos apomíticos e sexuais numa mesma espécie permitirá relacionar a expressão de *SERK* com a embriogênese e apomixia em *Brachiaria*.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar seqüências de *SERK* de *Brachiaria brizantha* e determinar seu padrão de expressão durante o desenvolvimento reprodutivo sexual e apomítico in vivo e durante a embriogênese somática, visando testar o seu potencial como ferramenta molecular para o monitoramento de processos de embriogênese in vitro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Dois acessos de *Brachiaria brizantha* cultivados em canteiros experimentais e casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram utilizados: BRA 00591 ($2n=4x=36$), tetraplóide correspondente à cultivar Marandu de reprodução apomítica e denominado B30; BRA 002747 ($2n=2x=18$), diplóide sexual denominado B105. Calos embriogênicos e suspensões celulares foram obtidos a partir de sementes maduras do acesso apomítico de *B. brizantha*, segundo protocolo descrito por (CABRAL et al., 2006). *B. decumbens* diplóide sexual BRA 004430 ($2n=2x=18$), D4, foi utilizada como fonte das anteras para cultura in vitro.

3.2 Clonagem da seqüência codificadora de *SERK* de *B. brizantha*

3.2.1 Coleta de ovários, anteras, flores hermafroditas, folhas, raízes, calos embriogênicos e agregados celulares embriogênicos para extração de RNA

Inflorescências de *B. brizantha* apomítica (B30) e sexual (B105) foram coletadas de plantas mantidas em campo e colocadas em recipiente contendo água para evitar a desidratação. Para extração de RNA flores hermafroditas, ovários e anteras de flores hermafroditas, em quatro estádios do desenvolvimento floral, de plantas mantidas no campo, e folhas jovens e raízes de plantas mantidas em vasos em casa-de-vegetação foram coletados. Os estádios de desenvolvimento foram os correspondentes às fases de esporogênese e gametogênese, com base na associação de características do pistilo, comprimento do estilete, presença e coloração do estigma (Figura 2.1; ARAÚJO et al., 2000). Ovários de flores em antese foram coletados no dia da abertura da flor. Foram coletados 250 ovários de cada estádio, 200 anteras para o estádio 1, 100 para o estádio 2 e 50 anteras para os estádios 3 e 4.

Todas as coletas foram feitas com auxílio de microscópio estereoscópico Zeiss Stemi SV11. Calos embriogênicos com 30 d de cultivo em meio de indução, agregados celulares embriogênicos com 15 d provenientes de suspensão celular foram coletados. Todo o material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C até o momento de uso.

Figura 2.1.- Estádios de desenvolvimento da antera e pistilo de *B.brizantha*, coletados para o isolamento de RNA e hibridização in situ. E = estágio

3.2.2 Extração de RNA total de ovários, anteras e agregados celulares embriogênicos

RNA total dos ovários, anteras e de agregados celulares embriogênicos foi extraído utilizando o reagente TRIZOL® (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. Cada amostra foi macerada em 250 μL de TRIZOL® em microtubos Eppendorf de 1,5 mL com o auxílio de pistilos, durante 1 min. Em seguida foi adicionada à cada tubo mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1; v/v). Após homogeneização em agitadores tipo *Vortex* as amostras foram incubadas no gelo durante 5 min e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C . Após centrifugação, a fase aquosa foi recolhida, dispensada em tubos novos sendo a ela adicionado o mesmo volume de isopropanol para precipitação do RNA. Após duas

horas de incubação a -20°C o material foi novamente centrifugado por 30 min, a 13.000 rpm, a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em 500 μL de etanol (70%) (livre de RNase), colocado para secar em capela de fluxo laminar vertical e ressuspensionado em 20 μL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC, SIGMA).

3.2.3 Extração de RNA total de flores, folhas, raízes e calos

Para a extração de RNA total de flores nos quatro estádios de desenvolvimento, folhas jovens, raízes e calos, aproximadamente 2 g de cada material, foram utilizados seguindo o método de precipitação por cloreto de lítio, descrito por (BERGER, 1987). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de pistilos em cadinhos livres de RNase. Ao macerado foram adicionados 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%) e incubado por 15 min à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 rpm, por 10 min, em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5415C). A fase aquosa foi transferida para tubos novos e os ácidos nucleicos precipitados com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M pH 4,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado por pelo menos 1 h 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% 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 10.000 rpm por 15 min a 4°C e o precipitado foi ressuspensionado em 1,8 mL de água tratada com DEPC 0,1%. Uma última precipitação foi feita com 200 μL de acetato de sódio 3 M e etanol absoluto a -20°C , por 1 h e centrifugada por 20 min a 10.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 200 μL de água gelada tratada com DEPC 0,1%.

3.2.4 Tratamento com DNase e verificação da integridade do RNA

Após a extração, todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante e, em seguida, purificadas com solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1.

A pureza e integridade do RNA, antes e após o tratamento com DNase, foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$ em tampão TBE 0,5x (5,4 g de Tris-HCl; 2,75 g de ácido bórico e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0) em condição livre de RNase. A quantificação foi feita por

espectrofotometria a 260 nm, utilizando o NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

3.2.5 Síntese de cDNA fita simples

Para a síntese de cDNA fita simples 1,5 µg de RNA total e 500 ng de oligo dT, contidos num volume de 11 µL de água tratada com DEPC 0,1%, foram incubados a 70 °C por 5 min e, em seguida, colocados no gelo por 2 min. Posteriormente, foram adicionados 4 µL do tampão de síntese de primeira fita de DNA, 2 µL de mistura de dNTPs, 1 µL de RNaseOut (Invitrogen) e 1 µL (200U) da enzima transcriptase reversa (*SuperScript™ First-Strand Synthesis System*, Invitrogen™). A reação foi incubada a 42 °C durante 1 h e, em seguida, 15 min a 70 °C para inativação da enzima. O cDNA foi tratado com 1 µL (5U) de RNase H, sendo incubado a 37 °C, por 20 min. O cDNA foi armazenado a –20 °C até o momento do uso.

3.2.6 Amplificação da sequência codificadora de *SERK*

O cDNA obtido a partir de RNA total de ovários, correspondendo ao estágio 4 de *B. brizantha* apomítica (B30), foi utilizado como molde para amplificação da sequência codificadora de *SERK* em *Brachiaria*, utilizando combinações de iniciadores degenerados, segundo Baudino et al. (2001) (Tabela 2.1). As combinações utilizadas foram: S3/S1; S5/S1; S3/S2; S4/S2; S5/S2. A sequência dos iniciadores e seu posicionamento dentro dos domínios da proteína são apresentados na Tabela 2.1 e na Figura 2.2

Tabela 2.1 – Iniciadores degenerados utilizados para amplificação de *SERK* em cDNA de *Brachiaria* e sua respectiva localização na proteína (BAUDINO et al., 2001)

Iniciador	Seqüência	Domínio estrutural
S1	5' TGTHACRTGGGTRTCCTTGTAATCCAT3'	Domínio quinase (exon VII)
S2	5' CGRTGMACWGCCATRCTIATCAT3'	Domínio quinase (exon III)
S3	5' GTGAAYCCTTGACATGGTTYCATGT3'	Zipper de leucina
S4	5' CCMTGYCCIGGATCTCCCCITTT3'	SSP
S5	5' ATGCACTSACYAATATYACWACYCTTCAAG3'	LRR

W = A ou T; R = A ou G; M = A ou C; Y = C ou T; H = A ou C ou T; S = C ou G; S1 e S2 = iniciadores *reverse*; S3, S4 e S5 = iniciadores *forward*

A reação de PCR foi feita em um volume final de 25 μ L, em solução contendo: 2,5 μ L de cDNA, 250 nM de dNTPs; 400 nM de cada iniciador; 2,5 U de Taq polimerase e 2,5 μ L de tampão 10X (Phoneutria). Uma reação sem o DNA molde foi utilizada como controle negativo. O programa de amplificação utilizado foi de 95 °C por 5 min, 34 ciclos a 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e uma extensão final de 5 min, a 72 °C, em termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 2.2 - Ilustração da estrutura geral de genes *SERK* e posição dos iniciadores degenerados utilizados na amplificação, conforme Tabela 2.1. PS = peptídeo sinal, ZIP = zíper de leucina, LRR = repetições ricas em leucina, SPP = região rica em prolina, TM = domínio transmembrana, C = região C terminal

3.2.7 Experimentos de 5' e 3' RACE (*Rapid amplification of cDNA ends*)

Com a finalidade de buscar regiões UTR não conservadas dos genes em estudo, experimentos de 5' e 3' RACE foram conduzidos a partir de uma biblioteca de cDNA fita dupla ligada a adaptadores, preparada conforme instruções do *Marathon™ cDNA Amplification Kit* (Clontech). A biblioteca foi obtida a partir de RNA poli A+ de ovários de *B. brizantha* apomítica (B30), estágio 4. Iniciadores *nested* para 5'RACE e 3' RACE foram desenhados no programa *Primer 3* (ROZEN; SKALETISKY, 2000) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Para a reação de PCR, 1 μ L da biblioteca foi utilizado como molde, usando os iniciadores *nested*, AP1 e AP2, conforme protocolo do kit. Os produtos de PCR foram purificados do gel e clonados no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). A especificidade dos produtos de PCR foi analisada após seqüenciamento.

3.2.8 Purificação e clonagem dos fragmentos

Os fragmentos amplificados foram recortados do gel e purificados utilizando o kit de extração de gel Qiaex II (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após quantificação, os fragmentos foram clonados no vetor PCR® 2.1 (*TA cloning Kit version V* - Invitrogen™), na proporção 3:1 de inserto:vetor. A ligação do inserto no vetor foi feita com a enzima T4 DNA ligase (Promega), seguindo instruções do fabricante. A transformação em *Escherichia coli* (células competentes XL1 blue) foi feita por eletroporação, utilizando 2 µL da ligação (inserto) e 40 µL de células competentes (1×10^8). Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina, 20 µg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-d-galactopiranosídeo) e 0,1 mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo), sendo mantidas a 37 °C por aproximadamente 12 h. Para a confirmação da presença do inserto no vetor, o DNA plasmidial contendo as seqüências amplificadas foi clivado com a enzima *EcoRI* e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.2.9 Seqüenciamento e análise das seqüências

O seqüenciamento dos clones contendo parte da seqüência codificadora da proteína *SERK* de *Brachiaria* foi realizado em seqüenciador automático de DNA ABI Prism 3700 - Applied Biosystems na Plataforma de Seqüenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Cinco clones positivos de cada combinação de iniciadores foram seqüenciados utilizando os iniciadores universais, M13 reverso e T7 quando no vetor PCR® 2.1 (*TA cloning Kit version V* - Invitrogen™) e T7 e SP6 quando no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega).

Os cromatogramas gerados no seqüenciador foram processados pelo programa PHRED (EWING et al., 1998). As seqüências com pelo menos 100 bases e com o valor de PHRED maior ou igual a 20 foram consideradas para a montagem. O programa CROSSMATCH foi utilizado para a limpeza dos vetores e a montagem dos contigs foi feita pelo programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). O acesso ao pipeline de execução destes programas foi através de uma interface web desenvolvida por Togawa e Brígido e pode ser acessada no endereço: <http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph>.

A localização dos iniciadores foi confirmada na sequência utilizando o programa do Microsoft Office Word 2003. Os contigs resultantes foram comparados com as seqüências depositadas no banco de dados não-redundante (NR) do NCBI, utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Para os clones de cDNA, as seqüências dos contigs com similaridade com a proteína *SERK* foram analisados pelo programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) para identificação do frame de leitura e tradução da proteína e também com o aplicativo bl2seq (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparação entre as seqüências. O programa Pfam (FINN et al., 2008), disponível em <http://pfam.sanger.ac.uk/>) foi utilizado para análise dos domínios estruturais da proteína.

3.2.10 Construção da árvore filogenética

O relacionamento filogenético entre as seqüências de *SERK* de *Brachiaria* e destas com as de outras espécies foi inferido através da construção de uma árvore filogenética. As seqüências de *Brachiaria* obtidas foram alinhadas com as seqüências de *SERK* de outras monocotiledôneas e dicotiledôneas, disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e TIGR agora disponível em (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). No total, 23 seqüências de proteínas anotadas como similares a *SERK* ou homólogos de *SERK* de 13 espécies de plantas foram selecionadas no banco de dados através do aplicativo BLASTp.

O múltiplo alinhamento das seqüências foi gerado pelo aplicativo Clustal W e a análise filogenética foi conduzida pelo programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, *MEGA versão 4.0* (TAMURA et al., 2007), disponível em <http://www.megasoftware.net/mega4>, utilizando o método de distância Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987). A confiabilidade de cada ramo da árvore foi estimada utilizando o teste Bootstrap (FELSENSTEIN, 1985).

3.3 Clonagem da sequência genômica de *SERK* de *B. brizantha*

3.3.1 Extração de DNA genômico

DNA genômico foi extraído de folhas bem jovens, não expandidas, utilizando método baseado no emprego do detergente brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987), com modificações. Folhas de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha* foram coletadas no campo e colocadas diretamente em nitrogênio líquido. Aproximadamente 2,0 g de folhas foram macerados em cadinho com

nitrogênio líquido e incubados a 65°C por 3 h em 15 mL de tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; EDTA 0,05 M pH 8,0; NaCl 0,5 M; SDS 2% p/v; PVP 1% p/v; β -mercaptoetanol 1% v/v). Foi então adicionado um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e misturado por inversão dos tubos. Em seguida, a mistura foi transferida para tubos de centrifuga Sorvall SS34 e centrifugada por 30 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos novos onde foi adicionado e misturado um volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O material foi centrifugado por 20 min, a 10.000 rpm, 4°C e o sobrenadante precipitado com 15 mL de isopropanol, por 2 h, a -20 °C. Após centrifugar por 30 min a 10.000 rpm, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de água destilada e transferido para microtubo de 1,5 mL onde foi tratado com 10 μ L de RNase A 10 mg/mL, por 30 min, a 37 °C. O DNA foi purificado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e, após centrifugação a 13.000 rpm, por 4 min, o sobrenadante foi recolhido em novo tubo. Foi adicionado 0,5 vol de acetato de amônio 7,5 M e incubado no gelo por 15 min. Em seguida, adicionou-se 1 vol de isopropanol e centrifugou-se por 15 min, a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R). O precipitado foi lavado em etanol 70% e ressuscitado em 500 μ L de água deionizada.

3.3.2 Amplificação da sequência genômica de *SERK*

A amplificação da sequência genômica do *SERK* foi realizada utilizando o protocolo descrito para amplificação do cDNA (item 3.2.6), exceto pela utilização de Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum High Fidelity, Invitrogen), por se tratar da amplificação de fragmentos longos. Para tal, 10 ng de DNA genômico de *B. brizantha* apomítica e sexual (B30 e B105) foram utilizados como molde para a reação de PCR, com as mesmas combinações de iniciadores degenerados descritas para amplificação do cDNA (Tabela 2.1). O programa de amplificação foi: 95 °C por 5 min, seguidos de 39 ciclos a 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, extensão por 5 min a 72 °C, finalizando a 72 °C por 5 min. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1% e os fragmentos purificados como descrito anteriormente foram clonados no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). O seqüenciamento e análise das seqüências foram realizados conforme descrito anteriormente para os clones de cDNA.

3.3.3 Southern Blot

3.3.3.1 Marcação da Sonda

Um fragmento de aproximadamente 996 pb contendo parte da sequência genômica de *SERK* de *B. brizantha* foi utilizado como sonda nos experimentos de Southern blot. A sequência foi amplificada com a combinação de iniciadores S5/S2 (Tabela 2.1) utilizando como molde o DNA genômico de B105, e posteriormente clonada no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Para reamplificação da sonda a combinação de iniciadores degenerados foi a mesma inicialmente utilizada, com 100 ng do plasmídio, contendo o inserto como DNA molde. A banda gerada foi recortada do gel e os produtos foram purificados com o kit “Wizard® SV gel and PCR clean up” (Promega). A verificação da integridade e estimativa da concentração do produto foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e com o auxílio do marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder® (Invitrogen). Para a síntese da sonda marcada com α^{32} P, 50 ng do produto da PCR previamente purificados foram utilizados. A síntese foi feita utilizando o kit Amershan® Ready-to-go DNA Labelling Beads (-dCTP) (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

3.3.3.2 Hibridização e detecção de sinal

Trinta µg de DNA total de *B. brizantha* apomítica e sexual foram digeridos a 37 °C por aproximadamente 18 h com as seguintes enzimas: *EcoRI*, *HindIII* e *XbaI*. As reações de digestão foram feitas em um volume final de 200 µL e após a digestão o DNA foi precipitado com 1/10 volumes de cloreto de amônio 3M e 2 volumes de etanol 100%. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5%. Posteriormente, o gel foi tratado com solução de depuração (HCl 0,25 M) por 10 min, incubado em solução de desnaturação de DNA (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 30 min e em seguida tratado com solução de neutralização (NaCl 1,5 M e tris-HCl 0,5 M, pH 7,2). O DNA foi transferido por capilaridade para membrana de náilon Amershan Hybond TM – N+ (GE Healthcare) em tampão salino SSPE 10X, durante 16 h. Após a desmontagem do sistema de transferência, a membrana foi secada por 30 min, a 80 °C. Em seguida o DNA foi fixado à membrana com tratamento de luz ultravioleta – UV Stratalinker® 2400 (Stratagene), de acordo com instruções do fabricante.

A pré-hibridização transcorreu a 65 °C por aproximadamente 18 h em 25 mL de solução contendo SSPE 5X, solução de Denhardt 2X (solução de Denhardt 100x = Polyvinylpyrrolidone 2%, BSA 2% e FicollTM 400 2%), SDS 0,1% e DNA de esperma de salmão 20µg/mL. A sonda previamente marcada foi desnaturada por 5 min a 95 °C e incorporada à solução de pré-hibridização, sendo incubada a 65 °C para hibridização. Após 20 h de hibridização a membrana foi lavada duas vezes em SSPE 2X por 30 min à temperatura ambiente, uma vez em solução em SSPE 1X por 30 min e uma vez em SSPE 0,5X por 30 min, a 65 °C. A membrana foi colocada no cassete contendo Imaging Plate (IP) e a imagem gerada no aparelho *Phosphoimager* (FUGIFILM FLA-3000). Em seguida a membrana foi exposta em filme (Kodak MXG/PLUS 18X24 cm), mantida a -80 °C durante 30 dias e revelada.

3.4 Análise da expressão de *SERK* de *B. brizantha* por transcrição reversa seguida por análise quantitativa de PCR (RT-qPCR)

Foi feita a análise de expressão da expressão do gene *SERK* de *Brachiaria*, denominado *BbrizSERK2*, conforme análise de seqüências apresentada em Material e métodos. Iniciadores específicos foram desenhados na região 3'UTR do gene com auxílio do aplicativo *Primer 3* (Tabela 2.2). Os iniciadores foram testados quanto à estabilidade, porcentagem de CG, temperatura de *melting* e formação de *hairpins*, homodímeros ou heterodímeros no programa *oligo analyzer* disponível no site <http://www.idtdna.eu/analyzer/applications/Oligoanalyzer>.

As reações de qRT-PCR foram conduzidas utilizando cDNA fita simples sintetizados a partir de 1,5 µg de RNA total de amostras coletadas dos acessos apomítico e sexual. As amostras analisadas foram: ovários e anteras em quatro estádios de desenvolvimento, ovários após antese, folhas e raízes e uma amostra contendo cDNA de flores hermafroditas nos quatro estádios de desenvolvimento. Do acesso apomítico foram ainda utilizados nesta análise calos embriogênicos, agregados celulares e embriões somáticos em momento avançado de desenvolvimento.

Cada reação de PCR foi feita em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL da mistura Sybr Green Rox plus (LGC Biotecnologia), 5 µL do cDNA diluído na proporção 1:100, 0,5 µL de cada iniciador (0,25µM) e 4 µL de água Milli-Q. Para o experimento foram utilizadas amostras em triplicata e um controle negativo (amostra sem DNA molde). O robô EpMotion 5070 (Eppendorf) foi utilizado na aplicação do cDNA e de uma mistura contendo os demais reagentes da reação em placas de 96 poços (Axigen). As placas foram seladas com película adesiva PCR film (Eppendorf). As reações foram feitas em termociclador *Real-time* PCR Mastercycler® ep realplex

(Eppendorf) usando as seguintes condições: 15 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 58 °C e 20 s a 72 °C. Para verificar a especificidade de amplificação dos genes, foi feita uma curva de dissociação após a reação, de 62°C a 94°C, com leitura a cada 1°C. Além disso, o produto amplificado foi seqüenciado para garantir a especificidade da reação.

Os dados de fluorescência gerados pelo programa Realplex 1.5 foram transportados para o programa Excel (Microsoft, Redmond, WA) e analisados no aplicativo visual basic do MS Excel qBase versão 1.3.4. (<http://medgen.ugent.be/qbase/>). O gene referência utilizado neste experimento foi *BbrizUBCE1* que codifica para Enzima de Conjugação a Ubiquitina, identificado por Silveira et al. (2009) para estudos de expressão por PCR em tempo real em *B. brizantha*.

Tabela 2.2 Iniciadores utilizados nos experimentos de PCR em tempo Real para análise da expressão de *SERK* em *B. brizantha*

Gene	Iniciador <i>forward</i>	Iniciador <i>reverse</i>
<i>BbrizSERK2</i>	5' TAGTCACTCCACGATTCCG3'	5' CAAATTGGCCCTAACAAATTC3'
<i>BbrizUBCE1</i>	5' GGTCTTGCTCTCCATCTGCT3'	5' CGGGCTGTCGTCTCATACTT3'

3.5 Análise da expressão dos genes *SERK* de *B. brizantha* por hibridização in situ

3.5.1 Coleta e preparo dos tecidos

Foram coletados de plantas de *B. brizantha* B30 apomítica e B105 sexual, ovários em quatro estádios de desenvolvimento antes da antese (ARAÚJO et al., 2000) e em três datas após a antese (DAP) (1 d, 2 d e 3 d), anteras em quatro estádios de desenvolvimento e anteras de *B. decumbens* cultivadas in vitro. Foram coletados também calos embriogênicos com 7 a 30 d em cultura e agregados celulares embriogênicos provenientes de cultura de células embriogênicas em suspensão com 15 d e agregados celulares com 7 d e 15 d em meio de regeneração.

As amostras foram coletadas sob microscópio estereoscópico e imersas imediatamente em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% e glutaraldeído

0,25% em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,2. As amostras foram submetidas ao vácuo por 1 h à temperatura ambiente. A solução fixadora foi renovada e as amostras foram mantidas a 4 °C durante a noite.

Em seguida as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0 e em seguida desidratadas em série etílica (30, 50, 70, 80, 85, 90, 95 e 100%), 1 h cada. Parte das amostras foi mantida em etanol 70% e estocada a –20 °C para ser utilizada em experimentos posteriores de hibridização. A outra parte foi embebida em séries crescentes de etanol:BMM (butyl methyl metacrilato, BMM) nas proporções 5:1, 5:2, 5:3, 5:4, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5; v/v e BMM puro (duas trocas), por pelo menos 4 h cada etapa até a proporção 5:4, e por pelo menos 24 h nas etapas seguintes. As amostras foram colocadas em cápsulas plásticas contendo BMM, e polimerizadas por 48 h, a 4 °C, sob luz ultravioleta 815 2537 Å (15 watts) e em seguida estocadas a –20 °C.

Secções de 4 µm foram obtidas em ultramicrotomo Leica Ultracut-UCT e colocadas em gotas de água tratada com DEPC em lâminas RNase free Probe On TM PLUS (Fischer Science Scientific). As secções foram esticadas com clorofórmio e as lâminas mantidas durante a noite em placa aquecedora a 60 °C. As lâminas foram então guardadas a 4 °C até o momento do uso. Antes da hibridização o BMM foi removido em acetona 100% (duas trocas de 10 a 15 min), acetona:água tratada com DEPC (1:1, v/v) por 10 min e duas vezes em água tratada com DEPC (10 min).

3.5.2 Síntese da sonda marcada com digoxigenina

Utilizou-se como molde um fragmento de 456 pb de uma região conservada que codifica o domínio SPP, específico de *SERK* e ausente nas demais proteínas LRR quinases, o domínio transmembrana e também parte do domínio quinase. Para obtenção desse fragmento, iniciadores específicos flanqueando essas regiões *SERK-F*(5'-CTCTCAGGAGAGGTGCCATC-3') e *SERK-R2* (5'-CACCGCCACCAATGAACCATCT-3') foram desenhados utilizando o programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). A amplificação ocorreu num volume final de 25 µL em solução contendo: 1 µL cDNA, 2,5 µL tampão Taq DNA polimerase (Phoneutria) (10x), 250 nM dNTPs; 400 nM de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria). O programa de amplificação usado foi: 94 °C por 1 min e 30 s, seguido por 31 ciclos de 94 °C 1 min, 55 °C 1 min e 30 s, e uma extensão final a 72 °C durante 4 min. A banda amplificada foi recortada do gel com lâmina de bisturi nova e os produtos purificados com o kit Wizard® SV gel and PCR clean up (Promega). O

fragmento foi clonado no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) que foi utilizado para transformação em *E. coli* XL1 blue . Para confirmar a presença do inserto do vetor, 10 colônias brancas foram selecionadas para PCR de colônia usando os iniciadores específicos *SERK-F* e *SERK-R2* e as mesmas condições de PCR descritas anteriormente. Para verificar a orientação do inserto no vetor, dois clones positivos foram seqüenciados com os iniciadores universais T7 e SP6. O clone escolhido para síntese da sonda foi estocado em glicerol 20% a -80°C .

O plasmídeo contendo o inserto foi utilizado como molde para amplificação da sonda utilizando as combinações de iniciadores T7 (*forward*) com iniciador específico *reverse* (*SERK-R2*) para a sonda senso e SP6 (*reverse*) com o iniciador específico *forward* (*SERK-F*) para a sonda antisenso. Os produtos das reações de PCR foram purificados em filtros Microcon® (Millipore), quantificados por eletroforese em gel de agarose 1% com o auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*. Para a síntese da sonda, 1 µg de cada um dos produtos purificados foi utilizado. As sondas de mRNA, senso e antisenso, foram sintetizadas por transcrição in vitro, utilizando o *DIG RNA Labeling kit (SP6/T7)* (Roche) de acordo com instruções do fabricante.

3.5.3 Verificação da concentração da sonda por eletroforese em gel de agarose e confirmação da marcação da sonda por *dot blot*

Para confirmar a marcação da sonda 1 µL de cada sonda sintetizada (senso T7 e antisenso SP6) e alíquotas do RNA controle DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) nas concentrações de 100, 150 e 200 ng, foram colocados em membrana de náilon (Amershan Hybond TM – N+ (GE Healthcare)), previamente umedecida em solução de Tris-HCl 10mM pH 7.5. A membrana foi secada por 30 min a 80°C , e o RNA fixado à membrana com tratamento de luz ultravioleta –UV Stratalinker® 2400 (Stratagene). A membrana foi lavada no tampão de detecção 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 7.5; NaCl 0,15 M) e em seguida incubada por 30 min no tampão de bloqueamento (2% Blocking Reagent®- Roche em tampão de detecção 1). Posteriormente, a membrana foi incubada por 30 min com o anticorpo Anti-Digoxigenina AP Fab Fragments (Roche) diluído 1:5.000 em tampão de detecção 1 adicionado de BSA (0.1%) (4,5 mL de tampão 1, 0,5 mL de BSA 1%, 1 µL de anti-dig AP). Em seguida, a membrana foi lavada em tampão de detecção 1 e exposta à solução de coloração, 15 µL NBT, 15 µL de BCIP em 5 mL de tampão de detecção 3 (Tris-HCl 0,1 M, pH 7.5, NaCl 0,1M, MgCl_2

0,05 M, com pH final ajustado para 9,5) no escuro por 10 min e por fim no tampão de detecção 4 (Tris-HCl 0,01 M pH 8,0; EDTA 1 mM) para cessar a reação. A concentração da sonda marcada, que apresentou coloração azul/violeta foi então estimada por eletroforese em gel de agarose 1,2% utilizando como padrão de concentração o mRNA marcado com digoxigenina, disponível no DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche). A concentração da sonda foi então ajustada para 10 ng/μL, como solução estoque para o preparo da solução de hibridização.

3.5.4 Reação de hibridização

Sessenta ng de tRNA de levedura (Gibco BRL®) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por 5 min e adicionados a 100 μL de tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, formamida 50%, EDTA 1 mM pH 8.0; solução de Denhardt 1X). Para a hibridização, 100 μL de solução de hibridização foram colocados em cada lâmina contendo as secções e cobertas com Parafilm®. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por um período de aproximadamente 15 horas.

3.5.5 Reação de pós-hibridização e detecção imunológica

Após a hibridização as lâminas foram lavadas em SSC 4X, 2X, 1X e 0,5X (solução SSC 20X = NaCl 3M, Na₃-citrato 0,3M, pH 7,2), por 30 min cada. Em seguida foram lavadas por 5 min em tampão de detecção 1 e incubadas por 30 min em tampão de bloqueamento. As secções foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por 5 min e incubadas durante 1 h com anticorpo Anti-Digoxigenina AP Fab Fragments (Roche) diluído 1:1.000 em tampão de detecção 1. Após duas lavagens seguidas, de 15 min cada em tampão de detecção 1 e uma lavagem de 5 min em tampão de detecção 3 as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 μL de BCIP (0,05 g/mL) e 4,5 μL de NBT (0,05 g/mL) em 1 mL de tampão 3 por 45 min no escuro. Para parar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 por 10 min. As lâminas foram montadas em glicerol 50%, examinadas em microscópio de luz Axiophot (Zeiss) e fotodocumentadas com câmera digital colorida (AxioCam Icc3 – Zeiss) e as imagens capturadas com o software Axiovision 4.7 (Zeiss). Após

análise as lamínas foram montadas em Permount® SP15-500 (Fisher chemicals-Fisher Scientific).

3.5.6 Hibridização in situ do tipo “whole mount”

Calos e agregados celulares oriundos de suspensões celulares previamente fixados e mantidos em etanol 70% a -20 °C foram utilizados. As amostras foram re-hidratadas em série decrescente de etanol (50%, 40%, 30%, 10%) por 20 min cada e, em seguida, em tampão Tris-HCl (0,01 M, pH 7,2), por 20 min. Posteriormente foram tratadas com proteinase K (12,5 µg/µL) a 37 °C, por 30 min. Após sucessivas lavagens em tampão Tris-HCL (0,01M pH 7,2) procedeu-se a hibridização, utilizando as mesmas sondas senso e antisenso já mencionadas. A hibridização foi realizada a 42 °C no *Thermomixer* (Eppendorf) em rotação de 300 rpm, por aproximadamente 18 h. As amostras foram lavadas em SSC 4X, 2X, 1X, 0,5X, por 4 vezes cada, sendo a última lavagem de cada feita por 30 min, a 42 °C e, por último, em água deionizada por duas vezes, por 5 min. Após as lavagens as amostras foram incubadas em solução de bloqueamento por 1 h, temperatura ambiente, e em seguida com anticorpo Anti-Digoxigenina AP Fab Fragments (Roche) (1:1.000 em tampão de detecção 1). Após várias lavagens em tampão de detecção 1, as amostras foram mantidas por 5 min em tampão 3. A reação de coloração foi feita no escuro em solução contendo 4,5 µL de BCIP (0,05 g/mL) e 4,5 µL de NBT (0,05 g/L) diluídos em 1 mL de tampão 3 por 45 min, e em seguida o material foi incubado em tampão de detecção 4 por 10 min. As amostras foram imersas em glicerol 100% e mantidas a 4 °C por 18 h e observadas ao microscópio Zeiss Axiophot, utilizando contraste diferencial de interferência e fotodocumentadas em câmera digital colorida (AxioCam lcc3 – Zeiss) e as imagens capturadas com o software Axiovision 4.7 (Zeiss).

3.5.7 Histologia de agregados celulares para observação detalhada do desenvolvimento

Agregados celulares e anteras cultivadas in vitro foram fixados (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e CaCl₂ 0,001 M em tampão cacodilato de sódio 0,2 M, pH 7,2), inicialmente sob vácuo por 1 h e mantidos por aproximadamente 36 horas nessa solução, a 4 °C. Após fixação as amostras foram desidratadas em série etílica (10 a

100%) e emblocadas em resina metacrilato (Historesin, Leica). Secções histológicas de 5 μ M foram obtidas em micrótomo rotativo e coradas com azul de toluidina 0,05% para análise estrutural. As secções foram montadas em resina sintética Entellan® (MERCK), cobertos com lamínula e analisados em microscópio óptico Zeiss Axioskop2 HBO 100 w/2 e fotodocumentadas. Algumas anteras em cultura foram também coletadas e analisadas, utilizando-se os mesmos procedimentos.

4. RESULTADOS

4.1 Clonagem da sequência codificadora de *SERK* de *Brachiaria brizantha*

4.1.1 Amplificação e clonagem das sequências

Todas as combinações de iniciadores utilizados para a amplificação do cDNA de *SERK* de *B. brizantha* apomítica (B30), (Tabela 2.1) produziram produtos de PCR. Entretanto clones positivos foram obtidos apenas da combinação dos iniciadores S5/S1, num total de 8 clones, que apresentaram um inserto de aproximadamente 900 pb. Da combinação de iniciadores degenerados S3/S1 foi possível isolar um clone positivo do cDNA de *B. brizantha* sexual (B105). O fragmento gerado foi de aproximadamente 1,9 Kb.

4.1.2 Análise da sequência nucleotídica de cDNA

Após a análise das sequências dos clones positivos obtidos da planta apomítica (B30) dois contigs foram gerados. A comparação dessas sequências com o banco de dados (NR) revelou alta identidade desses contigs com homólogos de *SERK*. O contig 1, com 918 pb apresentou maior identidade, entre 79% e 88% (e-value 0,0), com *SERK1* de outras monocotiledôneas especialmente milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana (*Saccharum officinarum*) (Tabela 3). O contig 2 com 923 pb apresentou uma maior identidade, entre 86 e 88% (e-value 0,0), com *SERK2* de milho, sorgo e com a sequência do *SERK2* de cana obtida através do TIGR. Utilizando a ferramenta bl2seq do NCBI verificou-se que a identidade entre os dois contigs é de 82%

Do fragmento de 1,9 Kb de B105 amplificado da combinação de iniciadores degenerados S3/S1, foram sequenciados 1.170 pb. Esta sequência também

apresentou maior identidade (90%, e-value 0,0) com *SERK2* de milho e sorgo e 95% de identidade com o contig 2 de B30, além de 250 nucleotídeos a mais na região 5'. Esta sequência não foi utilizada nas demais análises por necessidade de confirmação de sequenciamento.

Experimentos de 5' e 3' RACE para obtenção da sequência completa dos genes *SERK* de *B. brizantha* (B30) foram realizados. As reações de 5' RACE, em ambos os contigs produziram produtos de amplificação inespecíficos, sem qualquer identidade com genes *SERK*. Para o contig 2, entretanto, os experimentos de 3' RACE permitiram obter a região 3' completa, contendo o restante da sequência codificadora (parte do domínio quinase e C-terminal) e a região UTR. O fragmento 3' RACE clonado, com 1063 pb apresentou identidade de 84% com o *SERK2* das espécies já mencionadas, e possibilitou aumentar a sequência do contig 2 de 923 para 1.791 pb. Esta sequência maior apresentou entre 79 e 87% de identidade com homólogos de *SERK2* (Tabela 4). A região UTR sozinha possui 387 pb. Esse resultado não se repetiu para o contig 1, não permitindo amplificar a região 3'

Tabela 2.3 - Comparação da sequência nucleotídica do contig 1, resultante da análise de clones de cDNA de ovários de *B. brizantha* (B30), amplificado com iniciadores degenerados com sequências depositadas no banco de dados não-redundante (NR)

Acesso	Descrição	Banco de dados	Cobertura (%)	E-value	Identidade máxima (%)
GQ283907.1	<i>Saccharum</i> híbrido Cv. CP88-1762 <i>SERK1</i>	NCBI	97	0.0	88
XM_002447912.1	<i>Sorghum bicolor</i> <i>SERK1</i>	NCBI	98	0.0	88
NM_001111662	<i>ZmSERK1</i>	NCBI	97	0.0	86
AY652735	<i>OsSERK1</i>	NCBI	97	0.0	83
NM_001111663	<i>ZmSERK2</i>	NCBI	98	0.0	80
XM_002454009.1	<i>Sorghum bicolor</i> <i>SERK2</i>	NCBI	98	0.0	79

Tabela 2.4 - Comparação da sequência nucleotídica do contig 2, resultante da análise de clones de cDNA de ovários de *B. brizantha* (B30), amplificado com iniciadores degenerados, com seqüências depositadas no banco de dados não-redundante (NR)

Acesso	Descrição	Banco de dados	Cobertura (%)	E-value	Identidade Máxima (%)
XM_002454009.1	<i>Sorghum bicolor</i> <i>SERK2</i>	NCBI	94	0.0	87
NM_001111663	<i>ZmSERK2</i>	NCBI	91	0.0	86
TC79010	<i>SoSERK2</i>	TIGR	82	0.0	88
GQ283907	<i>Saccharum</i> <i>SERK1</i>	NCBI	81	0,0	86
XM_002447912	<i>Sorghum bicolor</i> <i>SERK1</i>	NCBI	81	0.0	79

4.1.3 Análise das seqüências de aminoácidos deduzidas dos contig 1 e contig 2 de *B. brizantha*

A análise das seqüências nucleotídicas pelo programa ORF finder (NCBI) confirmou a presença de *Open reading frame (ORF)* de 913 pb e 1503 pb nos contig 1 e contig 2, de *B. brizantha* respectivamente. O múltiplo alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas dos contigs com as seqüências que apresentaram maior identidade pelo BLASTn e BLASTp permitiu identificar domínios estruturais altamente conservados, característicos de *SERK* (Figura 2.3).

The diagram shows a horizontal line representing a linear genome. Above the line, there are several black rectangular blocks of varying sizes. The line is divided into two sections by a vertical line. The left section is labeled 'PS' and the right section is labeled 'ZIP'.

1. **Identify the main topic or purpose of the text.**
 2. **Summarize the key points or findings.**
 3. **Discuss the implications or conclusions.**
 4. **Provide a brief overview of the methodology or data used.**
 5. **Highlight any limitations or future research directions.**

LRR1	LRR2	LRR3	LRR4
------	------	------	------

	IRB5	SPP	
--	------	-----	--

TM QUINASE

QUINASE

QUINASE

Figura 2.3 – Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos de BbrizSERK1 e BbrizSERK2 com homólogos de outras monocotiledôneas, mostrando alta similaridade dos domínios estruturais das proteínas SERK. As setas (vermelha e verde) indicam o início das seqüências de *B. brizantha* e o retângulo vermelho, o final da seqüência de BbrizSERK1. PS = peptídeo sinal, ZIP = zíper de leucina, LRR = repetições ricas em leucina, SPP = região rica em prolina, TM = domínio transmembrana, C = região C terminal. Os resíduos marcados em preto indicam 100% de similaridade, enquanto os marcados em cinza ou branco, mostram diferenças nas seqüências.

A ORF deduzida do contig 1 de 304 aminoácidos inclui os motivos LRR5 e SPP, o domínio transmembranar e parte do domínio quinase. O contig 2 possui uma sequência de 467 aminoácidos que inclui os motivos LRR5, SPP, o domínio transmembranar, os domínios intracelulares quinase e C-terminal (Figura 2.4). A análise dos contigs no programa Pfam confirmou a presença de domínios característicos de proteínas quinases transmembrana do tipo LRR.

Figura 2.4 - Esquema comparativo dos domínios estruturais presentes nos fragmentos BbrizSERK1 e BbrizSERK2, com base no múltiplo alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas, em relação aos domínios estruturais da proteína SERK. PS = peptídeo sinal, ZIP = zíper de leucina, LRR = repetições ricas em leucina, SPP = região rica em prolina, TM = domínio transmembrana, C = região C terminal

A comparação das seqüências de aminoácidos deduzidas dos contigs mostrou que o contig 1 possui 87% de identidade com o contig 2 e entre 91 e 93% com *SERK1* de milho e sorgo, respectivamente. O contig 2, por sua vez, possui entre 93 e 94% de identidade com *SERK2* das espécies de gramíneas já mencionadas. Foram observadas algumas deleções na seqüência do contig 2 quando comparada àquela do contig 1. Estas deleções também são observadas nas seqüências de *SERK2* de milho, cana e sorgo. Algumas substituições de aminoácidos também foram observadas entre o contig 1 e o contig 2, sendo bastante conservadas entre esses dois genes em outras espécies (Figura 2.3).

O resultado da análise das seqüências permitiu nomear os contigs 1 e 2 *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2*, respectivamente.

A árvore filogenética não enraizada, construída com base na seqüência da proteína, que se estende do motivo LRR5 ao domínio quinase, utilizando o método de distância Neighbour-Joining, mostra um relacionamento muito próximo de *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2* com *SERK* de outras monocotiledôneas (Figura 2.5). A distribuição dos

clados observada na árvore se repetem quando utilizados outros métodos de estudo como UPGMA e Maximo Parsimônia (dados não apresentados).

Figura 2.5 – Árvore filogenética de proteínas SERK com base nas seqüências parciais de aminoácidos deduzidas, utilizando-se o método Neighbor-Joining. A árvore foi gerada no programa MEGA.

4.2 Clonagem da seqüência genômica de *SERK* de *Brachiaria brizantha*

4.2.1 Análise da seqüência genômica

Foram obtidos cinco contigs (Tabela 2.5) a partir de DNA genômico, utilizando combinação de iniciadores para a clonagem de *SERK* de *Brachiaria*. A combinação S1/S3 gerou um fragmento de aproximadamente 2,5 Kb. A análise do seqüenciamento de 14 clones, com iniciadores *forward* e *reverse*, geraram contigs de tamanhos entre 996 pb a 1.630 pb. Todos os clones obtidos com as combinações S5/S2 e S5/S1, tanto em B30, como em B105, apresentaram maior identidade (84 a 85%) com a seqüência genômica de *ZmSERK2* (acesso AJ400869 do NCBI). A análise do

seqüenciamento de um único clone obtido com a combinação S3/ S1 de B105 gerou um contig de 1.630 pb. Este contig, por sua vez, apresentou maior identidade (92-95%) com a seqüência codificadora de *SERK1* de cana, milho e sorgo (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Contigs obtidos a partir da amplificação de DNA genômico de *B. brizantha* B30 e B105 com iniciadores para clonagem de *SERK* e comparação com as seqüências depositadas no banco de dados (NR) do NCBI e TIGR

Genótipo	Tamanho do Contig	Combinações de iniciadores degenerados	Identidade com o Banco de dados	Cobertura	E-value
B30	996 pb	S5/S2	84% <i>ZmSERK2</i>	94%	0,0
B105	995 pb	S5/S2, S5/S1	84% <i>ZmSERK2</i>	94%	0,0
B105	1398 pb	S5/S1	87% <i>ZmSERK2</i>	88%	0,0
B105	996 pb	S5/S2	85% <i>ZmSERK2</i>	85%	0,0
B105	1630 pb	S3/S1	92 – 95% <i>SERK1</i> , mRNA <i>Saccharum</i> , <i>Zea</i> e <i>Sorgum</i>	70 – 71%	0,0

4.2.2 Determinação do número de cópias de *SERK* no genoma de *B. brizantha*

A análise dos experimentos de Southern blot (Figura 2.6) com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* detectou dois fragmentos, enquanto que com a enzima *XbaI*, não foi possível visualizar sinal de hibridização. A análise do resultado sugere a existência de pelo menos duas cópias de genes *SERK*, tanto na variedade apomítica quanto na sexual.

Figura 2.6 - Análise de *SERK* de *B. brizantha* por Southern blot. DNA genômico de folhas foi digerido com *EcoRI* e *HindIII* (em reações separadas). A região da sonda com 996 pb estende-se do motivo LRR ao domínio quinase. As setas apontam os dois fragmentos de DNA marcados em cada reação

4.3 Expressão de *BbrizSERK2* em *B. brizantha* por PCR em tempo real

Os iniciadores desenhados a partir da região não traduzida 3'UTR de *BbrizSERK2* geraram um amplicon de 110 pb. Considerando as análises preliminares apresentadas neste trabalho, verificou-se que *BbrizSERK2* é expresso em todos os órgãos analisados em *B. brizantha* apomítica e sexual, não sendo específico para tecidos reprodutivos (Figura 2.7).

Figura 2.7 – Quantificação da expressão relativa de *BbrizSERK2* durante o desenvolvimento de tecidos de: antera (ANT), calo, célula em suspensão (SC), embrião somático (ES), flor, folha, ovário (OV), ovário após antese (AA) e raiz de *B. brizantha* apomítica (B30) e sexual (B105). A quantidade relativa dos transcritos foi normalizada com um gene de referência. As barras verticais representam o desvio padrão

4.4 Localização da expressão de *SERK* de *Brachiaria brizantha* por hibridização in situ

As secções de ovário hibridizadas com a sonda senso não apresentaram sinal além da coloração de fundo (Figura 2.8a). No início da megasporogênese, transcritos de *SERK* foram detectados na CMM e nos tegumentos em desenvolvimento em ovários da planta sexual B105 (Figura 2.8b), enquanto em ovários da planta apomítica não foram detectados transcritos na fase correspondente de desenvolvimento (Figura 2.8c). Apenas um sinal fraco foi observado perto da parede do meiócito de B105 sexual e de algumas células do nucelo próximas aos tegumentos (Figura 2.8d). Um sinal fraco foi observado nas camadas externas do nucelo, nos tegumentos e nos megásporos em degeneração, e nenhum sinal no megásporo funcional (Figura 2.8e). Em ovários apomíticos, durante a megagametogênese, sinal fraco, acima da coloração de fundo, foi observado em todo o ovário incluindo as iniciais apospóricas e no cenócito (Figura 2.8f). Antes da antese, em ovários tanto de B105 (Figura 2.8g) quanto de B30 (Figura 2.8h) com sacos embrionários maduros, não foi observado sinal de hibridização. Após a antese, transcritos foram detectados em antípodas e aparato da oosfera, na planta sexual (Figura 2.8i) e na região micropilar de saco embrionário apomítico contendo pró-embrião (Figura 2.8j).

Figura 2.8 - Localização de transcritos de *SERK* em secções de ovários de *B. brizantha* com sonda senso (a) e anti-senso (b-j). a) B105 em megasporogênese, sem sinal de hibridização, mostrando apenas coloração de fundo. b) B105, sexual, mostrando forte sinal de hibridização, especialmente na célula-mãe do megásporo (CMM) e nos tegumentos (Tg). c) B30 em megasporogênese sem sinal de hibridização. d) B105 apresentando fraco sinal na parede no meiócito (Mc) e de algumas células no nucelo, próximo aos tegumentos (seta). e) B105, com fraco sinal de hibridização nos megásporos em degeneração (seta), camadas externas do nucelo (Nu) e tegumento (Tg) mostrando ausência de sinal no megásporo funcional (MF). f) B30 mostrando fraco sinal em todo ovário, incluindo inicial apospórica (IA) e cenócito (Co). g-h) sacos embrionários maduros (SE) de B105 e B30, respectivamente, sem sinal de hibridização. i) B105 após antese com sinal de hibridização em antípodas (AN) e aparato da oosfera (AO). j) B30, com sinal de hibridização na região micropilar (Mp) contendo pro-embrião (PE). Barras a = 20 μ m, b = 25 μ m, c = 50 μ m, d = 40 μ m, e = 40 μ m, f = 50 μ m, g = 40 μ m, h = 20 μ m, i = 50 μ m, j = 10 μ m

A Figura 2.9a mostra semente de *B. brizantha* no início da calogênese – calos com 7 d. Secções destes calos apresentaram sinal de hibridização com a sonda anti-senso no procâmbio do embrião da semente (Figura 2.9b). Em calos com 30 d (Figura 2.9c) a marcação foi observada em células periféricas dos calos (Figura 2.9d) e mais fortemente em pró-embriões (Figuras 2.9e,f).

Figura 2.9 - Indução de calos embriogênicos em sementes maduras de *B. brizantha* (B30) e localização da expressão de *SERK* por hibridização in situ. a-b) calos com 7 d de cultivo com sinal de hibridização nas células do procâmbio (PC). c,d) calos com 30 d de cultivo d) com sinal de hibridização nas células periféricas (setas). e) calo mostrando proembrião periférico com forte sinal de hibridização. f) detalhe do proembrião mostrado na figura e. Barras a = 1 mm, b = 50 μ m, c = 1,8 mm, d = 50 μ m, e = 20 μ m, f = 10 μ m

Agregados celulares embriogênicos provenientes de células em suspensão por 15 d (Figura 2.10a) após hibridização do tipo *whole mount*, apresentaram forte sinal de hibridização em massas pró-embriogênicas localizadas nas camadas externas dos agregados (Figura 2.10b, c) enquanto na região central assim como na hibridização com a sonda senso, não foi observada marcação (Figura 2.10d). Secções histológicas coradas com azul de toluidina indicaram que as massas pró-embriogênicas são constituídas por células pequenas e de citoplasma denso e nucléolos proeminentes (Figura 2.10e,g). Os resultados da hibridização *in situ* nestas secções confirmam a ocorrência mais abundante de transcritos nestas células (Figura 2.10e, g). Embriões somáticos observados após 7 a 15 dias em meio de regeneração (Figura 2.11a), apresentavam-se em estágio globular (Figura 2.11b), ou mais avançado. Estes embriões apresentaram expressão de *SERK* em todas as células incluindo as do escutelo (Figura 2.11c). A hibridização da sonda senso nestes embriões não mostrou sinal (Figura 2.11d).

O padrão de expressão de *SERK* em anteras de *B. brizantha* apomítica e sexual foi similar. A sonda senso não produziu sinal de hibridização (Figura 2.12a, f). Detectou-se expressão em anteras no início da microsporogênese, em célula-mãe do grão de pólen, CMP, e em células do tapete (Figura 2.12b). Em um estágio um pouco mais avançado da esporogênese, quando as CMPs estão envoltas por calose, a expressão só é observada nas células do tapete (Figura 2.12c). Nos estádios seguintes de desenvolvimento da antera e do grão de pólen, nenhuma marcação acima do ruído de fundo foi observada (Figura 2.12d, e).

Em cultura, nas anteras hibridizadas com a sonda senso nenhum sinal foi detectado nos micrósporos e na parede da antera (Figura 2.13a). Hibridização com a sonda antisense resultou na marcação de algumas anteras (Figura 2.13b). Em alguns micrósporos binucleados com divisão simétrica, e no citoplasma de alguns micrósporos vacuolizados foi observada marcação (Figura 2.13c, d). Em outras anteras cultivadas nas mesmas condições, a hibridização com a sonda anti-senso não produziu sinal (Figura 2.13e, f). As análises histológicas mostraram que nestas anteras foram encontrados micrósporos uni-nucleados e bi-nucleados.

Figura 2.10 Localização de transcritos em agregados celulares provenientes de células de *B.brizantha* em suspensão. a) agregados com 15 d de cultivo. b,c) hibridização do tipo *Whole mount* com a sonda anti-sendo mostrando sinal nas massas proembriogênicas (seta), d) hibridização com a sonda senso mostrando ausência de sinal, e-f) secções em historresina mostrando as massas proembriogênicas com células pequenas de citoplasma denso e nucléolos proeminentes, g-h) hibridização in situ em secções, com a localização de transcritos nestas regiões (seta). Barras a = 1,8 mm, b = 50 μ m, c = 20 μ m, d = 20 μ m, e = 200 μ m, f = 100 μ m, g = 100 μ m, h = 40 μ m

Figura 2.11 - Localização de transcritos de *SERK* em embriões somáticos de *B. brizantha* em meio de regeneração. a) embriões em meio de cultura. b) secção de embrião em historresina corada com azul de toluidina, mostrando embriões globulares. c-d) escutelo dos embriões somáticos, c) hibridizado com sonda anti-senso com forte sinal de hibridização e d) ausência de sinal na sonda senso. Barras a = 3 mm, b = 100 μ m, c = 20 μ m, d = 20 μ m

Figura 2.12 - Localização dos transcritos de *SERK* em secções de anteras de *B. brizantha*. a) sonda senso com ausência de sinal de hibridização. b) B105 no início da microsporogênese hibridizado com a sonda anti-senso mostrando forte sinal de hibridização nas células-mãe do grão de pólen (CMP) e células do tapete (T). c) B105 em estágio mais avançado da microsporogênese com forte expressão no tapete (T) e ausência de sinal nas células-mãe do grão de pólen. d) anteras em estágio de megagametogênese com ausência de sinal na antera e micrósporos. Barras = 50 μ m

Figura 2.13 - Localização dos transcritos de *SERK* em anteras de *B. decumbens* cultivadas in vitro. a) sonda sense sem sinal de hibridização. b) hibridização com sonda antisense mostrando sinal em alguns micrósporos. c-d) hibridização com sonda antisense com forte sinal em micrósporos com divisão simétrica (setas) e sinal no citoplasma de micrósporos vacuolizados (cabeça de seta). e-f) anteras sem sinal de hibridização, f) presença de micrósporo binucleado (seta) contendo os núcleos vegetativo (nV) e generativo (nG). Barras a = 20 µm, b = 40 µm, c = 20 µm, d = 10 µm, e = 40 µm, f = 20 µm

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho duas seqüências (contigs) contendo parte da região codificadora de membros da família proteínas SERK (*Somatic Embryogenic Receptor-Like Kinase*) foram isolados por PCR a partir de cDNA de ovários, coletados antes da antese, de *B. brizantha* apomítica (B30). Os iniciadores degenerados utilizados para a amplificação foram desenhados a partir das seqüências altamente conservadas das proteínas SERK de *Daucus* e *Arabidopsis*, por Baudino et al. (2001) para isolamento de SERK de milho. A análise dos dois contigs no programa Pfam confirmou a presença de domínios estruturais característicos de proteínas quinases, confirmando que estas seqüências estão funcionalmente relacionadas à superfamília serina/treonina e tirosina kinases (HANKS et al., 1995). A comparação das seqüências dos contigs no banco de dados mostrou maior identidade com as proteínas SERK1 e SERK2 de outras espécies especialmente de monocotiledôneas como *Zea mays*, *Saccharum officinarum* e *Sorgum bicolor*. O múltiplo alinhamento das seqüências de aminoácidos permitiu identificar os domínios estruturais característicos das proteínas SERK. Com base nestas características, os contigs 1 e 2 foram nomeados *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2* e são possíveis ortólogos de SERK em *B. brizantha*. As diferenças relativas às seqüências de aminoácidos deduzidas de *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2* são observadas principalmente pela ocorrência de algumas deleções na seqüência de *BbrizSERK2*, também observadas nas seqüências de SERK2 de milho, cana e sorgo. É possível observar diferenças nas seqüências de aminoácidos deduzidas de *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2*, com algumas substituições como observado em ortólogos destes genes (Figura 2.3). Estas deleções e substituições possibilitaram a distinção entre SERK1 e SERK2 em *Brachiaria*

A construção de uma árvore filogenética utilizando o método de distância genética Neighbor-Joining (NJ) mostrou um relacionamento muito próximo das seqüências de *B. brizantha* com homólogos de SERK1 e SERK2 de outras espécies. A topologia da árvore obtida está de acordo com outros estudos filogenéticos com proteínas SERK apresentados na literatura, os quais colocam SERK de monocotiledôneas e dicotiledôneas em ramos separados (SANTOS et al., 2005; SHARMA et al., 2008). Entre as monocotiledôneas, a única espécie que não agrupou foi *Poa pratensis* (ALBERTINI et al., 2005), cujas seqüências isolaram-se num único clado, demonstrando também, neste estudo, uma maior proximidade com homólogos de dicotiledôneas.

As seqüências genômicas obtidas utilizando as diferentes combinações de iniciadores degenerados poderão servir para o desenho de primers para obtenção da sequência genômica completa, utilizando a técnica de genoma

Embora não tenham sido tratados neste trabalho os dados preliminares da sequência de *SERK B. brizantha* sexual, existe interesse em dar continuidade nestes estudos, pois possíveis diferenças nas seqüência codificante em relação à planta apomítica pode indicar a existência de regulação pós-transcricional deste gene. Esse pode ser um fator envolvido na diferenciação de sacos embrionários de plantas sexuais e apomíticas.

Experimentos de Southern blot foram realizados utilizando uma sonda de uma região altamente conservada, com o intuito de inferir o número de cópias de genes *SERK* no genoma de plantas de *B. brizantha* apomítica e sexual. Com as enzimas de restrição testadas foram detectados dois fragmentos tanto na planta apomítica, quanto na sexual. A análise do resultado sugere a existência de pelo menos duas cópias de genes *SERK* tanto na variedade apomítica quanto na sexual, possivelmente uma cópia de cada gene, *BbrizSERK1* e *BrizSERK2*.

Como receptores de proteínas quinase da subclasse LRR as proteínas *SERK* são constituídas por um domínio extracelular caracterizado por um peptídeo sinal (PS), seguido por um zipper de leucina (ZIP), 5 repetições ricas em leucina (LRRs) e por um domínio rico em prolina (SPP), que é exclusivo de *SERK*, diferenciando-as das demais proteínas RLKs. A provável função das RLKs em plantas é a transdução de sinais ambientais ou de células vizinhas, mediando respostas específicas ao longo do desenvolvimento, que incluem crescimento, reações de auto-incompatibilidade, sinalização por hormônio, e imunidade em plantas (BECRAFT, 1998; BECRAFT, 2002). Entre os diversos membros dessa família o gene *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase*) foi caracterizado em diversas espécies como um integrante da rota de transdução de sinais que controla a embriogênese somática. Um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar a expressão de genes *SERK* de *B. brizantha* durante a reprodução sexual e apomítica e testar a utilização desse gene como um marcador de embriogênese durante a cultura in vitro, na embriogênese somática e embriogênese do micrósporo.

Neste trabalho não foi possível distinguir o padrão de expressão de *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2*, pois até o momento apenas a região 3'UTR de *BbrizSERK2* foi obtida, por experimentos de 3'RACE. Contudo, outros experimentos de 3'RACE, com a utilização de novos iniciadores serão ainda realizados para buscar essas seqüências.

A expressão de *BbrizSERK2* foi analisada por RT-qPCR em ovários e anteras em diferentes estádios do desenvolvimento, folhas e raízes de plantas apomíticas (B30) e sexuais (B105), bem como em calos com 30 dias de cultivo, agregados celulares provenientes de células em suspensão e embriões somáticos do genótipo B30. Os resultados preliminares desse experimento demonstraram expressão em todos os órgãos analisados, sem inespecificidade para órgãos reprodutivos. Esse padrão indica que possivelmente a expressão desse gene seja constitutiva, necessitando-se de novas análises e outras repetições biológicas para confirmação desse padrão. Um padrão de expressão constitutivo para *SERK2* tem sido descrito para *Oryza sativa* (ITO; TAKAYA; KURATA., 2005) e em *Zea mays* um padrão de expressão relativamente uniforme também foi observado em todas as amostras analisadas por RT-PCR semiquantitativo (BAUDINO et al., 2001). Em *Vitis vinifera* a expressão de *SERK2* também foi descrita como constitutiva nas diferentes fases da embriogênese somática (SCHELLENBAUM et al., 2008). Além desse padrão de expressão, em *Arabidopsis* foi observado que ocorre um baixo nível de expressão (COLCOMBET et al., 2005).

A sonda utilizada para hibridização *in situ* corresponde a uma região conservada, que se estende do domínio SPP até parte do domínio quinase, hibridizando, portanto com todos os RNAs de genes da família *SERK*. A região SPP foi escolhida por diferenciar as proteínas *SERK* das demais receptores do tipo quinase da subclasse LRR. Assim para a localização da expressão será considerado expressão de *BbrizSERK* de modo geral.

Em *Poa pratensis* transcritos de *SERK* foram detectados em CMM de planta sexual, mas não da planta apomítica. Nesta, a expressão foi observada nas células nucleares neste mesmo estágio. Assim, foi sugerido que *PpSERK* participa no desenvolvimento de sacos embrionários (ALBERTINI et al., 2005). A presença de transcritos de *BbrizSERK* na CMM apenas na planta sexual de *B. brizantha* e ausência de expressão neste mesmo estágio na planta apomítica, não permite associar *SERK* com a formação de saco embrionário de forma geral como em *Poa*. Em *Brachiaria* a ausência de expressão na CMM pode indicar que na planta apomítica ocorre uma desregulação ou repressão de certos genes antes que a meiose aconteça, interferindo na viabilidade dos produtos da divisão meiótica. Na planta sexual a CMM vai após a meiose produzir megásporos reduzidos, um dos quais é funcional, o que não ocorre na planta apomítica, que embora seja capaz de formar tétrade de megásporos, nenhum deles atua como funcional. Essa expressão na CMM foi também observada em óvulos de *A. thaliana* (HECHT et al., 2001). Em ovários da planta sexual a expressão de *BbrizSERK* também foi detectada nos tegumentos do óvulo em desenvolvimento.

Essas células estão em atividade metabólica bastante intensa, em divisão celular e alongamento, o que sugere que o gene *SERK* poderia também atuar na sinalização do desenvolvimento dos tecidos esporofíticos do óvulo. Alternativamente, como sugerido para *Arabidopsis* (HECHT et al., 2001) é possível que a expressão de *SERK* indique a capacidade embriogênica destes tecidos como acontece em plantas que se reproduzem por embrionia adventícia.

Em *B. brizantha*, assim como ocorreu com *B. decumbens* (DUSI, 2001) a expressão de *SERK* não foi encontrada no megásporo funcional da planta sexual nem nas iniciais apospóricas da planta apomítica, células que entrarão em mitose para formar os sacos embrionários. Em *A. thaliana* na via de reprodução, transcritos de *SERK* foram encontrados, além da CMM e do megásporo funcional, nas células do saco embrionário sugerindo que todas elas têm competência embriogênica (HECHT et al., 2001). Em *B. brizantha* a ausência de transcritos observada antes da antese, tanto nos sacos embrionários meióticos quanto nos apospóricos, indicaria que estas células não têm competência embriogênica. Em contrapartida esta competência pode ter sido adquirida após a antese quando as antípodas e aparato da oosfera da sexual apresentaram transcritos. Na planta apomítica a expressão foi observada na região micropilar contendo proembrião dos sacos embrionários de apomíticos. Este padrão observado é similar ao encontrado em *B. decumbens* (DUSI, 2001). A qualidade das secções de ovários maduros antes da antese não permitiu visualizar com clareza a oosfera que no caso de *B. decumbens* apomítica, apresentou presença de transcritos (DUSI, 2001). No entanto, após a antese, é possível também que a ausência de sinal de hibridização na região da oosfera seja devida ao estágio de desenvolvimento dos ovários analisados. Tanto em *B. brizantha* quanto em *B. decumbens* (DUSI; WILLEMSE, 1999) a ativação da oosfera e mesmo o início do desenvolvimento do embrião podem ocorrer antes mesmo da antese. Entretanto, nos ovários utilizados para hibridização in situ não foram encontrados embriões antes da antese e apenas pró-embriões fora encontrados após a antese,.

O gene *SERK* foi caracterizado como um gene marcador de embriogênese somática em *Daucus carota* e *A. thaliana* (SCHMIDT et al., 1997; HECHT et al., 2001), marcando a transição de células somáticas em células embriogênicas. A análise dos resultados da localização de transcritos de *BbrizSERK* por hibridização in situ durante a embriogênese somática em *B. brizantha* B30 mostrou a presença de transcritos apenas na região procâmbio do eixo embrionário do embrião apomítico das sementes, aos 7 dias de indução. A expressão em células procambiais também foi observada em explantes provenientes de hipocótilos de *Arabidopsis* e *Daucus* (KWAAITAAI; DE VRIES, 2007; SCHIMDT et al., 1997) cultivados em meio contendo 2,4-D. Em *Daucus*,

células alongadas originadas do procâmbio são as que se tornam competentes para embriogenesis e expressam o gene *SERK1* (SCHIMDT et al., 1997). Em *Arabidopsis* a expressão foi observada antes da cultura, e após o tratamento com 2,4-D maior expressão foi observada (KWAAITAAI; DE VRIES, 2007). Em *Brachiaria* as células vacuolizadas resultantes da proliferação de células do eixo embrionário, não apresentaram expressão de *BbrizSERK* nesta fase. Diferentemente, transcritos de *BbrizSERK* foram localizados em proembriões e em massas pró-embriogênicas na periferia de agregados celulares provenientes de células em suspensão, constituídas por células pequenas, com citoplasma denso e núcleos proeminentes, características de células embriogênicas. Embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento, quando o escutelo já está desenvolvido, também apresentaram expressão de *BbrizSERK* em contraste com o observado em *D. carota* e *A. thaliana*, nas quais a expressão é observada até a fase cordiforme de desenvolvimento do embrião. Em *Dactylis glomerata*, uma outra monocotiledônea, a expressão de *SERK* também foi observada em embriões em estádios mais avançados de desenvolvimento no meristema apical, escutelo, coleóptilo e coleorriza (SOMLEVA et al., 2000). É possível que esse mesmo padrão seja observado em outras monocotiledôneas como visualizado em *Brachiaria*. Os resultados das hibridizações em culturas embriogênicas indicam uma conservação do padrão de expressão em relação a outras espécies, e confirmam a função de *SERK* como um marcador de embriogênese somática também em *Brachiaria*.

Plantas sexual e apomítica de *B. brizantha* têm uma rota de desenvolvimento similar produzindo grão de pólen viável e apresentaram mesmo padrão de expressão in situ de *BbrizSERK*, com forte expressão de *BbrizSERK* no início da microsporogênese, nas CMP que são células diplóides que após a meiose formarão os micrósporos uninucleados. Em milho (BAUDINO et al., 2001) forte expressão de *ZmSERK1* foi observada no micrósporo uninucleado, estágio utilizado no início da cultura androgênica, enquanto em *Brachiaria*, não foi observada a expressão de *BbrizSERK* neste estágio nem nos estádios subsequentes do desenvolvimento do grão de pólen. É possível que esta diferença no momento da expressão de *SERK* esteja relacionada à recalcitrância observada na cultura de anteras de *Brachiaria* descrita no presente trabalho. Interessantemente a expressão de *BbrizSERK* também foi observada na CMM da planta sexual, equivalente à CMP no óvulo. A expressão de *BbrizSERK* também é observada nas células do tapete, permanecendo até a completa degradação deste tecido. O tapete exerce um importante papel no desenvolvimento dos grãos de pólen, na liberação de compostos que irão nutrir os micrósporos em desenvolvimento (HESS; HESSE, 1994) e na biossíntese de precursores de

esporolenina, responsáveis pela formação da exina que compõe a parede do pólen (WILSON; ZHANG, 2009). O papel de genes *SERK* na especificação do tapete foi observado em *A. thaliana*. Estudos com mutantes demonstraram que a dupla-mutação de *AtSERK1* e *AtSERK2* resulta no desenvolvimento de plantas macho-estéreis (ALBRECHT et al., 2005; COLCOMBET et al., 2005), e ressaltam um importante papel desses genes na esporogênese masculina. Por analogia, em *Brachiaria*, a presença de transcritos de *SERK* no tapete indica que esses podem também exercer um papel no desenvolvimento do grão de pólen.

A localização de transcritos de *BbrizSERK* nas CMPs das plantas apomítica e sexual e na CMM da planta sexual bem como no tapete da antera e no nucelo do óvulo, ambos tecidos relacionados com a nutrição e manutenção do desenvolvimento dos esporócitos, indica uma possível função deste gene na esporogênese em *Brachiaria* de forma geral.

A expressão de *BbrizSERK* em culturas embriogênicas de *B. brizantha* apomítica (B30) foi semelhante ao padrão encontrado em outras espécies, demonstrando que esse gene poderia ser usado em *Brachiaria* como um marcador de embriogênese somática. A expressão de *SERK* em anteras em cultura é restrita a alguns micrósporos, alguns apresentando divisão simétrica e a algumas anteras, sugerindo que apenas uma pequena quantidade de micrósporos são induzidos em cultura. Esse resultado, combinado com divisão simétrica são indícios que a iniciação do processo de androgênese tem ocorrido. A ausência de expressão em micrósporos uni- bi- ou tri-nucleados em anteras in vivo, reforçam essa idéia. Em outras culturas, a quantidade de micrósporos que adquirem a capacidade embriogênica em cultura, observada pela presença de calos embriogênicos também é baixa (PETERS et al., 1999). A otimização das condições de cultivo de anteras para o desenvolvimento dos micrósporos induzidos é necessária para a confirmação da capacidade embriogênica.

Em *Brachiaria* o desenvolvimento de um protocolo de indução de haplóides e duplo-haplóides poderá servir como ferramenta biotecnológica para o estudo da apomixia. A introdução de gene *SERK* sob controle de promotores específicos para direcionar a expressão em micrósporos utilizando técnicas de transformação genética poderá auxiliar na resposta embriogênica.

Este estudo representa um avanço no entendimento da relação expressão de *SERK* e embriogênese em *Brachiaria*, indicando seu potencial como um gene marcador. Embora se tenha observado expressão de *BbrizSERK* em alguns micrósporos cultivados, experimentos para refinar a utilização de *SERK* como marcador na androgênese de *Brachiaria* necessitam ser efetuados. Além disso, a detecção da expressão de *SERK* na planta sexual e ausência na planta apomítica em

ovários em megasporogênese pode ser indicar sua participação na regulação do modo de reprodução, sendo necessário mais estudos.

CONCLUSÕES GERAIS

- Foi descrito o desenvolvimento morfológico das anteras in vivo e a dinâmica dos tecidos esporofíticos em relação à ontogenia do grão de pólen de *B. brizantha* sexual até a antese.
- Nas condições de cultura in vitro testadas para indução de embriogênese, anteras contendo micrósporos uninucleados foram recalcitrantes.
- Foi observada formação de calo em poucas anteras nos meios ML1G1 e YP, porém sem continuidade no processo de embriogênese.
- Micrósporos binucleados com divisão simétrica foram observados em anteras em cultura em meio YP, sugerindo um possível desvio na rota de desenvolvimento desses micrósporos para uma rota esporofítica.
- Foram identificados cDNAs correspondentes à região codificadora do gene *SERK* em *B. brizantha* apomítica, com alta identidade com homólogos de *SERK* de monocotiledôneas. A identidade das seqüências e os resultados de filogenia permitiram nomear esses contigs como *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2*.
- Análise de *Southern blot* demonstrou a existência de pelo menos duas cópias de genes dessa família em *B. brizantha* apomítica e sexual, possivelmente *BbrizSERK1* e *BbrizSERK2*.
- A expressão de *BbrizSERK2*, analisada por RT-qPCR, não foi específica para órgãos reprodutivos.
- A localização diferencial de transcritos de *SERK*, em ovários em megasporogênese de plantas apomíticas e sexuais, indica envolvimento deste gene no desenvolvimento reprodutivo de *Brachiaria*.
- A expressão de *SERK* observada em CMP, células do tapete, das plantas sexual e apomítica e na CMM e em nucelo da planta sexual apontam para *SERK* uma função durante a esporogênese feminina e masculina em *Brachiaria*.
- O padrão de expressão de *SERK* observado em proembriões e embriões somáticos em estágio avançado de desenvolvimento, de forma semelhante ao relatado para outras espécies, indica que *BbrizSERK* é um marcador de embriogênese somática em *Brachiaria*.
- A presença de transcritos de *SERK* em micrósporos em divisão, alguns apresentando divisão simétrica, de anteras cultivadas in vitro, indica que a iniciação da embriogênese do micrósporo em *Brachiaria* ocorreu, contudo, sem continuidade no desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

AFZA, R.; SHEN, M.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; XIE, J.; FUNDI, H. K.; LEE, K. S.; BOBADILLA-MUCINO, E.; KODYM, A. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. **Plant Science**, Amsterdam, v.153, p.155-159, 2000.

AHMADABADI, M.; RUF, S.; BOCK, R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). **Transgenic Research**, Heidelberg, v.16, p.437-448, 2007.

ALBERTINI, E.; MARCONI, G.; REALE, L.; BARCACCIA, G.; PORCEDDU, A.; FERRANTI, F.; FALCINELLI, M. *SERK* and *APOSTART*. Candidate Genes for Apomixis in *Poa pratensis*. **Plant Physiology**, Rockville, v.138, n.4, p.2185-2199, 2005.

ALBRECHT, C.; RUSSINOVA, E.; KEMMERLING, B.; KWAAITAAL, M.; DE VRIES, S. C. *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE* proteins serve Brassinosteroid-Dependent and independent signaling pathways. **Plant Physiology**, Rockville, v.148, p.611–619, 2008.

ALBRECHT, C.; RUSSINOVA, E.; HECHT, V.; BAAIJENS, E.; DE VRIES, S. C. The *Arabidopsis thaliana* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1* and 2 Control Male Sporogenesis. **Plant Cell**, Baltimore, v.17, p.3337–3349, 2005.

ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.

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

ALVES, E. R. **Localização da expressão de genes durante o desenvolvimento de ovários de plantas de *Brachiaria brizantha* sexual e apomítica**. 2007. 164p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2007.

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

ANDRADE, R. P. **Pasture seed production technology in Brasil**. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceedings...** São Pedro, 2001. p.129-132.

ARAÚJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste**, Paris, v.23, n.1-2, p.13-28, 2000.

ARAÚJO, A. C. G.; NOBREGA, J. M.; POZZOBON, M. T.; CARNEIRO, V. T. D. C. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v.144, p.39-50, 2005.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoria genética de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.57, p.61-76, 2008.

ARNOLD; S. V. SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.69, p.233-249, 2002.

ASADUZZAMAN, M.; M. A. BARI; M. H. RAHMAN; N. KHATUN; M. A. ISLAM ; M. RAHMAN. In vitro plant regeneration through anther culture of five rice varieties. **OnLine Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, Pakistan, v.3, n.2, p.167-171, 2003.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298p.

BARNES, S. H.; BLACKMORE, S. Ultrastructural organization of two tapella types in angiosperms. **Archives Histologicals and Cytological**, London, v.55, p.217-224, 1992.

BAUDINO, S.; HANSEN, S.; BRETTSCHEIDE, R.; HECHT, V. F. G.; DRESSELHAUS, T.; LÖRZ, H.; DUMAS, C.; ROGOWSKY, P. M. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. **Planta**, Berlin, v.213, p.1-10, 2001.

BECRAFT, P. W. Receptor kinases in plant development. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.3, n.10, p.384-388, 1998.

BECRAFT, P. W. Receptor kinase signaling in plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.18, p.163-192, 2002.

BERGER, S. L. Preparation and characterization of RNA: overview. In: BERGER, S. L.; KIMMEL, A. R. (Ed.). **Guide to molecular cloning techniques**. San Diego: Academic Press, 1987. v.152, p.215-219.

BICKNELL, R. A. Model systems to study the genetics and developmental biology of apomixis. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.; DRESSELHAUS, T. (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. México-DF: CIMMYT, 2001. cap.8.

BONNER, L. J.; DICKINSON, H. G. Anther dehiscence in *Lycopersicon esculentum* Mill, aspectos estruturais. **New Phytologist**, v. 113, p. 97-115, 1989

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. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, Baltimore, v.14, n.8, p.1737-1749, 2002.

BÜYÜKKARTAL, H. N.; ÇÖLGEÇEN, H.; MARASALI, B. Development of anther wall throughout microsporogenesis in *Vitis vinifera* L. Cv. Çavus. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, Pakistan, v.7, n.4, p.616-619, 2005.

CABRAL, G. B.; OLIVEIRA, L.; LACERDA, A. L. M.; CAMPOS, V. T. **Efeito de meios de cultura e da pressão osmótica na transformação genética de suspensão**

celular de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf (Poaceae) cv. Marandu. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 5p. (Circular Técnica, 57).

CABRAL, G. B.; SANTANA, C. G.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A.; MATSUMOTO, K. **Ocorrência de albinismo em embriogênese somática repetitiva em *Brachiaria brizantha*.** Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 7p. (Boletim de Pesquisa, 155).

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia.** Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 92p.

CHASAN, R. Breaching the callose wall. **Plant Cell**, Baltimore, v.4, p.745-746, 1992.

CHIAPPETTA, A.; FAMBRINI, M.; PETRARULO, M.; RAPPARINI, F.; MICHELOTTI, V.; BRUNO, L.; GRECO, M.; BARALDI, R.; SALVINI, M.; PUGLIESI, C.; BITONTI, M. B. Ectopic expression of *LEAFY COTYLEDON1-LIKE* gene and localized auxin accumulation mark embryogenic competence in epiphyllous plants of *Helianthus annuus* x *H. tuberosus*. **Annals of Botany**, Oxford, v.103, n.5, p.735-747, 2009.

CHU, C. C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Beijing, China. **Proceeding...** Perking: Science Press, 1978. p.43-50.

COLCOMBET, J.; BOISSON-DERNIER, A.; ROS-PALAU, R.; VERA, C. E.; SCHROEDER, J. I. *Arabidopsis* **SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 Are Essential for Tapetum Development and Microspore Maturation.** **Plant Cell**, Baltimore, v.17, p.3350-3361, 2005.

DATTA, S. K. Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. **Current Science**, Bangalore, v.89, n.11, p.1870-1878, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Amsterdam, v.19, p.11-15, 1987.

DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.** 2000. Thesis (Doctoral) - Wageningen University, Wageningen, 2001.

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

DUVALL, M. R. Anatomical study of anther development in *Acorus* L.: Phylogenetics Implications. **Plant Systematics and Evolution**, Wien, v.228, p.143-152, 2001.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v.8, n.3, p.175-185, 1998.

FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. **Acta Biologica Szegediensis**, Szeged, v.52, n.1, p.53-56, 2008.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.74, n.3, p.201-228, 2003.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, Rochester, v.39, p.783-791, 1985.

FINN, R. D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P. C.; SAMMUT, S. J.; HOTZ, H. R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S. R.; SONNHAMMER, E. L.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, London, v.36, p.D281-D288, 2008.

FISHER, M. J.; KERRIDGE, P. C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; D. VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p.43-52.

GENOVESI, A. D.; COLLINS, G. B. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. **Crop Science**, Madison, v.22, p.1137-1144, 1982.

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

GOLDBERG, R. B.; BEALS, T. P.; SANDERS, P. M. Anther development: basic principles and practical applications. **Plant Cell**, Baltimore, v.5, n.10, p.1217-1229, 1993.

GONZÁLEZ, A. M. T.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v.37, p.36-44, 2005.

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

GÚZMAN, M.; ARIAS, F. J. Z. Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. **Plant Science**, Amsterdam, v.151, p.107-114, 2000.

HAECKER, A.; GROSS-HARDT, R.; GEIGES, B.; SARKAR, A.; BREUNINGER, H.; HERRMANN, M.; LAUX, T. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v.131, p.657-668, 2004.

HANKS, S. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. **Genome Biology**, v. 4, p. 111-117, 2003.

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

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J. P.; HARTOG, M. V.; SCHMIDT, E. D.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S. C. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, n.3, p.803-816, 2001.

HEESE, A.; HANN, D. R.; GIMENEZ-IBANEZ, S.; JONES, A. M. E.; HE, K.; LI J.; SCHROEDER, J. I.; PECK, S. C.; RATHJEN, J. P. The receptor-like kinase *SERK3/BAK1* is a central regulator of innate immunity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.104, n.29, p.12217–12222, 2007.

HESS, M. W.; HESSE, M. Ultrastructural observations on anther tapetum development of freeze-fixed *Ledebouria socialis* Roth (Hyacinthaceae). **Planta**, Berlin, v.192, n.3, p.421-430, 1994.

HOEKSTRA, S.; BERGEN, S. V.; BROUWERSHAVEN, I. R. V.; SCHILPEROORT, R. A.; HEIDEKAMP, F. The interaction of 2,4-D application and mannitol pretreatment in anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. **Journal Plant Physiology**, Jena, v.148, p.696-700, 1996.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Woodbury, v.9, p.868-877, 1999.

HUALA, E.; SUSSEX, L. M. Determination and cell interaction in reproductive meristems. **Plant Cell**, Baltimore, v.5, p.1157-1165, 1993.

ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K.; AKASHI, R. Multiple shoot formation, somatic embryogenesis and plant regeneration from seed-derived shoot apical meristems in ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Grassland Science**, Tokyo, v.55, p.46–51, 2009.

ITO, Y.; TAKAYA, K.; KURATA, N. Expression of *SERK* family receptor-like protein Kinase genes in rice. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1730, p.253-258, 2005.

JIMÉNEZ, V. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.13, n.2, p.196-223, 2001.

KALTCHUK-SANTOS, E.; MARIAH, J. E. A.; MUNDSTOCK, E.; HU, C.Y.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Cytological analysis of early microspore divisions and embryo formation in cultured soybean anthers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 49, N. 2, P. 107-115, 1997.

KANG, T. J.; YANG, M. S.; DECKARD, E. L. The effect of osmotic potential on anther culture in spring wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, p.35-40, 2003.

KANTAMA, L.; LAMBERT, Y.; HU, H.; JONG, H. D.; DE VRIES, S. C.; RUSSINOVA, E. Use of the SSLP-based method for detection of rare apomictic events in a sexual *AtSERK1* transgenic *Arabidopsis* population. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.19, p.73-82, 2006.

KARAMI, O.; AGHAVAISI, B.; POUR, A. M. Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. **Journal of Chemical Biology**, Berlin, v.2, p.177–190, 2009.

KARAMI, O.; SAIDI, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v.36, 2009.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. D. **Estratégias de desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb. no Brasil**. Brasília: Embrapa Cerrados; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006.

KARLOVA, R.; BOEREN, S.; RUSSINOVA, E.; AKER, J.; VERVOORT, J.; DE VRIES, S. C. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 Protein Complex Includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. **Plant Cell**, Baltimore, v.18, p.626–638, 2006.

KISELEV, K. V.; TCHERNODED, G. K. Somatic Embryogenesis in the *Panax ginseng* Cell Culture Induced by the rolC Oncogene Is Associated with Increased Expression of *WUS* and *SERK* Genes. **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v.45, n.4, p.445-452, 2009.

KISELEV, K. V.; TURLENKO, A. V.; ZHURAVLEV, Y. PgWUS expression during somatic embryo development in a *Panax ginseng* 2c3 cell culture expressing the rolC oncogene. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v.59, p.237-243, 2009.

KIVIHARJU, E.; PEHU, E. The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.54, p.97-104, 1998.

KIVIHARJU, E. M.; TAURIAINEN, A. A. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and kinetin in anther culture of cultivated and wild oats and their interspecific crosses: plant regeneration from *A. sativa* L. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.18, p.582–588, 1999.

KOBE, B.; KAJAVA, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 6, p. 725-732, 2001.

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

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

KOTT, L. S.; POLSONI, L.; BEVERSDORF, W. D. Cytological aspects of isolated microspore culture of *Brassica napus*. **Canadian Journal Botany**, v. 66, p.1658-1664, 1988

KWAAITAAL, M. A. C. J.; DE VRIES, S. The *SERK1* gene is expressed in procambium and immature vascular cells. **Journal of Experimental Botany**, Wageningen, v.58, n.11, p.2887-2896, 2007.

KWONG, R. W.; BUI, A. Q.; LEE, H.; KWONG, L. W.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. **Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 5-18. 2003.

LAUX, T.; MAYER, K. F.; BERGER, J.; JURGENS, G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v.122, n.1, p.87-96, 1996.

LENIS-MANZANO, S. J. **Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria* spp, por bombardeamento de partículas**. 1998. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 1998.

LI, J.; CHORY, J. A Putative Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase Involved in Brassinosteroid Signal Transduction. **Cell**, Cambridge, v.90, p.929-938, 1997.

LI, H.; DEVAUX, P. High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. **Plant Science**, Amsterdam, v.164, p.379-386, 2003.

LI, J.; WEN, J.; LEASE, K. A.; DOKE, J. T.; TAX, F. E.; WALKER, J. C. BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. **Cell**, Cambridge, v.110, p.213-222, 2002.

LOTAN, T.; OHTO, M.; YEE, K. M.; WEST, M. A. L.; LO, R.; KWONG, R. W.; YAMAGISHI, K. FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. **Cell**, Cambridge, v.93, p.1195-1205, 1998.

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

MAIA, V. **Técnica histológica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1979. 246p.

MARASCHIN, S. F.; PRIESTER, W.; SPAINK, H. P.; WANG, M. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. **Journal Experimental of Botany**, Oxford, v.56, n.417, p.1711-1726, 2005.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT, N. S. Flor. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p.329-373.

MEDEIROS, J. D.; MÜLLER, S. C. O desenvolvimento das anteras e do gametófito masculino em *Callophylum brasiliensis*. **Biotemas**, Passo Fundo, v. 9, n. 1, p. 81-89. 1996.

MEINKE, D. W.; FRANZMANN, L. H.; NICKLE, T. C.; YEUNG, E. C. Leafy Cotyledon mutants of Arabidopsis. **Plant Cell**, Baltimore, v.6, p.1049-1064, 1994.

MENDES-BONATO, A. B.; FELISMINO, M. F.; KANESHIMA, A. M. S.; PESSIM, C.; CALISTO, V.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Abnormal meiosis in tetraploid genotypes of *Brachiaria brizantha* (Poaceae) induced by colchicine: its implications for breeding. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.50, n.2, p.83-87, 2009.

MENDES-BONATO, A. B.; JUNQUEIRA FILHO, R. G.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. D.; PENTEADO, M. I. O. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International**, Amsterdam, v.26, n.7, p.641-646, 2002.

MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. D. **Brachiaria**: biology, agronomy and improvement. Cali, Colombia: CIAT, 1996. v.1, 258p.

MORAES, A. P.; BERED, F.; CARVALHO, F. I. F.; KALTCHUK-SANTOS. Morphological markers for microspore developmental stage in maize. Brazilian archives of biology and technology, v. 51, n. 5, p. 911-916, 2008.

MORAES-FERNANDES, M. I. B.; STIVAL, A. L.; BRAMMER, S. P.; GRANDO, M. F. Haploidização: genética e melhoramento. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; E BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 1999. p.613-650.

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

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

NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; ROSE, R. J. Auxin Up-Regulates *MtSERK1* Expression in Both *Medicago truncatula* Root-Forming and Embryogenic Cultures. **Plant Physiology**, Rockville, v.133, p.218–230, 2003.

NOLAN, K. E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R. J. Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTORLIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.60, n.6, p.1759–1771, 2009.

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

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, Wein, v.59, p.368-373, 1964.

OKUMUS, A.; HASSAN, L.; AHMAD, S. D. The direct regeneration of maize haploids through anther culture. **Journal of Biological Science**, v. 1, n. 10, p. 900-901, 2001.

OZIAS-AKINS, P.; DIJK, P. J. V. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.41, n.1, p.509-537, 2007.

PALOVAARA, J.; HAKMAN, I. WOX2 and polar auxin transport during spruce embryo pattern formation. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v.4, p.153-155, 2009.

PARSONS, J. J. Spread of African pasture grasses to the American tropics. **Journal of Range Management**, Oakland, v.25, p.12-17, 1972.

PÉREZ-NÚÑEZ, M. T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J. L.; ZUNIGA-AGUILAR, J. J.; OROPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.28, n.1, p.11-19, 2008.

PESSINO, S. C.; ORTIZ, J. P. A.; LEBLANC, O.; DO VALLE, C. B.; EVANS, C.; HAYWARD, M. D. Identification of a maize linkage group related to apomixis in

Brachiaria. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.94, n.3, p.439-444, 1997.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 1999. p.569-611.

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

PULIDO, A.; BAKOS, F.; CASTILLO, A.; VALLÉS, M. P.; BARANABAS, B.; OLMEDILHA, A. Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. **Journal of Structural Biology**, v. 149, n. 2, p. 170-181, 2005

RAO, I. M.; KERRIDGE, P. C.; MACEDO, M. C. M. Nutritional requirements of *Brachiaria* and adaptation to acid soils. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; D. VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: EMBRAPA, 1996. v.1, p.53-71.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. v.1, 728p.

REISER, L.; FISCHER, R. The ovule and the embryo Sac. **Plant Cell**, Baltimore, v.5, p.1291-1301, 1993.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; D. VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: Embrapa, 1996. v.1, p.1-15.

REYNOLDS, T. L. Pollen embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v.33, p.1-10, 1997.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* Stapf (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.5, n.4, p.837-845, 2006.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Heidelberg, v.132, p.365-386, 2000.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular cloning** – a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. v.3.

SANDERS, P. M.; BUI, A. Q.; WETERINGS, K.; MCINTIRE, K. N.; HSU, Y.-C.; LEE, P. Y.; TRUONG, M. T.; BEALS, T. P.; GOLDBERG, R. B. Another developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.11, n.6, p.297-322, 1999.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L. R.; DORNELAS, M. C.; VIANA, A. M. *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.79, p.53-61, 2004.

SANTOS, E. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.165-173, 2002.

SANTOS, M. O.; ROMANO, E.; YOTOKOC, K. S. C.; TINOCO, M. L. P.; DIASA, B. B. A.; ARAGÃO, F. J. L. Characterisation of the cacao *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, Amsterdam, v.168, p.723-729, 2005.

SCHELLENBAUM, P.; JACQUES, A.; MAILLOT, P.; BERTSCH, C.; MAZET, F.; FARINE, S.; WALTER, B. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvL1L* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.27, p.1799-1809, 2008.

SCHMIDT, E. D.; GUZZO, F.; TOONEN, M. A.; DE VRIES, S. C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v.124, n.10, p.2049-2062, 1997.

SHARMA, S. K.; MILLAM, S.; HEIN, I.; RYAN, G. J. Cloning and molecular characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. **Planta**, Berlin, v.228, p.319-330, 2008.

SHERWOOD, R. T. **Genetic analysis of apomixis**. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.; DRESSSELHAUS, T. (Ed.). **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. México-DF: CIMMYT, 2001. cap.5, p.64-82.

SHIMADA, T.; HIRABAYASHI, T.; ENDO, T.; FUJII, H.; KITA, M.; OMURA, M. Isolation and characterization of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* gene homologue (*CitSERK1*) from *Citrus unshiu* Marc. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.103, n.2, p.233-238, 2005.

SHIU, S. H.; BLEECKER, A. B. Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. **Science STKE**, Washington, v.113, p.1-13, 2001a.

SHIU, S. H.; BLEECKER, A. B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.98, n.19, p.10763-10768, 2001b.

SILVEIRA, E. D.; RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; LEITE, J. A.; COSTA, S. S.; CARNEIRO, V. T. C. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **Journal of Plant Biotechnology**, New York, v.5, n.2, p.87-93, 2003.

SILVEIRA, E. D.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARÃES, L. A.; SILVA, F. R.; CARNEIRO, V. T. C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 84, p. 1-10-2009.

SINGLA, B.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Characterization of three SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE GENES from wheat, *Triticum aestivum*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, n. 27, p. 833- 843, 2008

SOLÍS, M. T.; PINTOS, B.; PRADO, M. J.; BUENO, M. Á.; RASKA, I.; RISUENO, M. C.; TESTILLANO, P. S. Early markers of in vitro microspore reprogramming to embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). **Plant Science**, v. 174, n. 6, p. 597-605, 2008

SOMLEVA, M. N.; SCHMIDT, E. D. L.; DE VRIES, S. C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.19, p.718–726, 2000.

SOUZA, F. H. D.; POTT, E. B. O.; PRIMAVESI, A. C. C.; BERNARDI, E.; RODRIGUES, A. A. **Usos alternativos da palhada residual da produção de sementes para pastagens**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. v.1. 241p.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, Amsterdam, v.26, p.1-2, 1969.

STEINER, N. **Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* (Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene *SERK***. 2009. 74p. Tese (Doutorado) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2009.

STONE, S. L.; KWONG, L. W.; YEE, K. M.; PELLETIER, J.; LEPINIEC, L.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Plant Cell**, Baltimore, v.15, p.5-18, 2003.

SU, Y.; XIANG, H.; ZHAO, Y.; LIU, Y. B.; ZHANG, C. L.; O'NEILL, S. D.; ZHANG, X. S. Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, New York, v.59, p.448–460, 2009.

SYNGENTA BIOTECHNOLOGY, PATENT DEPARTMENT, INC. E. Schmidt, S. De Vries, V. Hecht. **Apomixis conferred by expression of SERK interaction proteins**. US 20020069433, 19 Apr. 2001, 06 Jun. 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.24, n.8, p.1596-1599, 2007.

TANAKA, I. Development of male gametes in flowering plants. **Journal Plant Research**, Heidelberg, v.106, p.55-63, 1993.

THAKARE, D.; TANG, W.; HILL, K.; PERRY, S. E. The MADS-Domain transcriptional regulator *AGAMOUS-LIKE15* promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and *Soybean*. **Plant Physiology**, Rockville, v.146, p.1663–1672, 2008.

THOMAS, C.; MEYER, D.; HIMBER, C.; STEINMETZ, A. Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot

organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.42, p.35–42, 2004.

TOHME, J.; PALACIOS, N.; LENIS, S.; ROCA, W. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; D. VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: EMBRAPA, 1996. v.1, p.196-204.

TOURAEV, A.; VICENTE, O.; HEBERLE-BORS, E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. **Trends in Plant Science**, Maryland Heights, v.2, p.297-302, 1997.

TREJO-TAPIA, G.; MALDONADO AMAYA, U.; SALCEDO MORALES, G.; SANCHEZ, A. D.; MARTINEZ BONFIL, B.; RODRIGUEZ-MONROY, M.; JIMENEZ-APARICIO, A. The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.71, p.41–46, 2002.

TUCKER, M. R.; ARAUJO, A. C. G.; PAECH, N. A.; HECHT, V.; SCHMIDT, E. D. L.; ROSSELL, J. B.; DE VRIES, S. C.; KOLTUNOW, A. M.G. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **Plant Cell**, Baltimore, v.15, n.7, p.1524-1537. 2003.

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

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v.56, n.4, p.460-472, 2009.

VALLE, C. B. D. **Coleção de germoplasma de espécies de Brachiaria no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande: EMBRAPA, CNPQC, 1990. 33p. (Documentos, 46).

VALLE, C. B. D.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; D. VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali-Colombia: CIAT; Campo Grande-Brasil: EMBRAPA, 1996. v.1, p.147-163.

VIDAL, W. N.; VIDAL, R. R. **Botânica – Organografia**. Viçosa-MG: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 1992. 113p.

WEST, M. A. L.; HARADA, J. J. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. **Plant Cell**, Baltimore, v.5, p.1361-1369, 1993.

WILLESEN, M. T. M. **Sexual reproduction and dispersal in seed plants**. Wageningen, 1992. 49p.

WILSON, Z. A.; ZHANG, D. B. From *Arabidopsis* to *rice*: pathways in pollen development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.60, n.5, p.1479-1492, 2009.

WORRALL, D.; HIRD, D. L.; HODGE, R.; PAUL, W.; DRAPER, J.; SCOTT, R. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. **Plant Cell**, Baltimore, v.4, p.759-771, 1992.

XIE, J. H.; GAO, M. W.; LIANG, Z. Q.; SHU, Q. Y.; CHENG, X. Y.; XUE, Q. Z. The effect of coll-pretreatment on the isolated microspore culture and free amino acid change of anthers in japonica rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v.151, p.79-82, 1997.

ZHU, C.; PERRY, S. E. Control of expression and autoregulation of *AGL15*, a member of the MADS-box family. **Plant Journal**, New York, v.41, p.583–594, 2005.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: A model for development in higher plants. **Plant Cell**, Baltimore, v.5, p.1411-1423, 1993.

ZUR, I.; DUBAS, E.; GOLEMIEC, E.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; JANOWIAK, F.; WEDZONY, M. Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticales (*X Triticosecale* Wittm.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.94, p.319-328, 2008.