



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

**Caracterização de sequências de DNA expressas  
durante o desenvolvimento de órgãos reprodutivos de  
*Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf**

**Ana Luiza Machado Lacerda**

**Brasília, 2012**



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

**Caracterização de sequências de DNA expressas  
durante o desenvolvimento de órgãos reprodutivos de  
*Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf**

Ana Luiza Machado Lacerda

Orientação: Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular oferecido pelo Departamento de Biologia Celular - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília, 2012

Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Vegetal da Embrapa Recursos  
Genéticos e Biotecnologia

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

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Cristiano Castro Lacorte (Embrapa, Cenargen) – Membro externo

Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão (Embrapa, Cenargen; UnB) – Membro interno

Prof<sup>a</sup>. Dra. Leila Maria Gomes Barros (Embrapa, Cenargen) – Membro externo

Prof. Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo (UnB) – Membro externo

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

**Membro Suplente:**

Prof. Dr. Giovanni Rodrigues Vianna (Embrapa, Cenargen) – Membro externo

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Maria Luiza e Eustáquio, que sempre acreditaram no meu sucesso e me deram todo suporte necessário para eu realizar meus sonhos! Me incentivaram a sempre seguir em frente, sempre do meu lado enfrentando qualquer desafio. Amo muito vocês! Muito obrigada por tudo!

Ao Paulo, por estar sempre ao meu lado!!! Nossa história começou junto com o doutorado então você estava presente em cada momento de conquista e desânimo, sempre com paciência, palavras de apoio me incentivando a prosseguir!!! Te amo!!

A minha orientadora Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro por acreditar mais uma vez no meu trabalho, me proporcionando condições para seguir em frente. Pelos ensinamentos, pelas conversas pelo incentivo, carinho e amizade! Muito obrigada por tudo!

A Dra. Diva Dusi pelo apoio, revisão dos textos, pelos ensinamentos na área de microscopia e hibridização in situ. E principalmente pela amizade!!

A Gláucia Cabral pelos ensinamentos nos trabalhos de cultura de tecidos e transformação de arroz. Pela amizade e as boas conversas!

As grandes amigas do laboratório de Apomixia: Larissa e Lilian por todo o apoio e ajuda em todos os momentos, ensinamentos nos trabalhos de *Arabidopsis*. Nos tornamos grandes amigas fora do laboratório!!!

Ao Júlio Carlyle pela grande ajuda nas análises de *Genome walking* e PCR quantitativo!

A Ana Cristina Gomes pela grande ajuda nos cortes dos ovários para in situ. Pelo carinho, amizade. As amigas Maria Laine e Érica pelas palavras de incentivo e apoio total! Vocês são amigas especiais!

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelas condições necessárias para poder executar o trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.



Ao departamento de Biologia Celular pela oportunidade de fazer o Doutorado em Biologia Molecular.

A equipe da Plataforma Genômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo sequenciamento das amostras.

Aos amigos do laboratório de transformação genética sempre dispostos a ajudar.

Aos Drs. Cristiano Castro Lacorte, Julio Carlyle Macedo Rodrigues e Leila Maria Gomes Barros por participarem da qualificação deste trabalho e pelas contribuições feitas.

A banca examinadora desta tese composta pelos professores Dr. Cristiano Castro Lacorte, Dr. Francisco José Lima Aragão, Dra. Leila Maria Gomes Barros, Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo e Dr. Giovanni Rodrigues Vianna, por todas as contribuições para finalização deste trabalho.

Aos meus irmãos pelo carinho e apoio! Ao Nelson pelo incentivo, apoio e amizade.

A toda a minha família que sempre acreditou em mim, muito obrigada pelo carinho!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho!

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <i>Brachiaria</i>.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Reprodução em <i>Brachiaria</i> .....	3
1.1.2. Melhoramento genético em <i>Brachiaria</i> .....	4
<b>1.2. Apomixia .....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Tipos de apomixia .....	5
1.2.2. Controle genético da apomixia .....	6
1.2.3. Interesse no estudo da apomixia .....	7
<b>1.3. Identificação de seqüências de cDNA específicas de ovário .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Proteínas ribossomais.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5. Estudo de promotores.....</b>	<b>10</b>
1.5.1. Transformação de plantas modelos - <i>Arabidopsis</i> e Arroz .....	12
1.5.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
1.5.1.2. Arroz .....	12
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Material vegetal.....</b>	<b>15</b>
3.2.1. Extração de ovários e anteras.....	15
3.2.2. Extração de RNA de ovários e anteras.....	15
3.2.3. Extração de RNA de folhas e raízes.....	16
<b>3.3. Amplificação dos terminais dos cDNAs por 5' RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA ends</i>) .....</b>	<b>17</b>
3.3.1. Purificação de mRNA de ovários de <i>B. brizantha</i> .....	17
3.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA .....	17
3.3.3. Síntese da segunda fita de cDNA.....	18

3.3.4. Ligação dos adaptadores ao cDNA .....	18
3.3.5. Desenho dos iniciadores .....	19
3.3.6. Reação de 5' RACE – <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> .....	20
<b>3.4. Amplificação das regiões promotoras pela técnica de <i>genome walking</i> (<i>Genome Walker</i><sup>TM</sup> <i>Universal Kit</i>) .....</b>	<b>20</b>
3.4.1. Construção das Bibliotecas .....	20
3.4.2. Ligação dos Adaptadores .....	21
3.4.3. Desenho dos iniciadores .....	21
3.4.4. Reações de <i>Genome Walking</i> .....	22
<b>3.5. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação .....</b>	<b>23</b>
3.5.1. Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação .....	24
3.5.2. Mini-preparação de DNA plasmidial .....	24
<b>3.6. Sequenciamento de DNA .....</b>	<b>25</b>
3.6.1. Análise das sequências .....	25
<b>3.7. Clonagem das sequências nos vetores .....</b>	<b>26</b>
3.7.1. pGpro2 (Genbank: EU147786) (Thilmony et al., 2006; Thilmony et al., 2009) .....	26
3.7.2. pCAMBIA1391Z .....	27
3.7.3. Ligação dos insertos nos vetores pGpro2 e pCAMBIA1391Z .....	28
<b>3.8. RT-qPCR (PCR quantitativo) .....</b>	<b>29</b>
3.8.1. Desenho dos iniciadores .....	29
3.8.2. Preparo do cDNA e Reação de RT-qPCR .....	29
<b>3.9. Hibridização in situ .....</b>	<b>30</b>
3.9.1. Preparação dos ovários .....	30
3.9.2. Secção dos ovários .....	31
3.9.3. Remoção do BMM .....	31
3.9.4. Teste com laranja de acridina .....	31
3.9.5. Preparo da sonda marcada com digoxigenina .....	32
3.9.6. Reação de hibridização .....	33
3.9.7. Reação de pós-hibridização e detecção imunológica .....	33
<b>3.10. Transformação de plantas modelo – Arroz e <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>34</b>
3.10.1. Transformação de Arroz cv. Primavera .....	34

3.10.1.1. Meios de cultura com diferentes concentrações de higromicina para seleção de unidades embriogênicas.....	34
3.10.1.2. Cultura de Tecidos.....	35
3.10.1.3. Análises estatísticas .....	36
3.10.1.4. Parâmetros de biobalística usados para transformação genética de unidades embriogênicas de arroz .....	36
3.10.1.4.1. Precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio.....	36
3.10.1.4.2. Condições de bombardeamento .....	37
3.10.1.4.3. Análise histoquímica do gene <i>GUS</i> .....	37
3.10.2. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	37
3.10.3. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	38
3.10.3.1. Análise das plantas transformadas.....	38
3.10.3.1.1. Extração de DNA de folha para PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	39
3.10.3.2. Análise histoquímica do gene <i>GUS</i> .....	39
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Anotação funcional de sequências de cDNA de expressão em ovários .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. Amplificação das sequências codificadoras e regiões promotoras putativas pelas técnicas de 5'RACE e <i>Genome walking</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Análises quantitativas da expressão dos clones 04, 07, <i>BbrizRPS8</i>, <i>BbrizRPS15a</i> e <i>BbrizRPL41</i> por RT-qPCR.....</b>	<b>44</b>
4.3.1. RT-qPCR - <i>B. brizantha</i> .....	45
4.3.2. RT-qPCR - Arroz cv. Primavera.....	47
<b>4.4. Localização da expressão dos clones 04, <i>BbrizRPS8</i>, <i>BbrizRPL41</i>, <i>BbrizMMF</i> e <i>BbrizSec13</i> em células e tecidos de ovários e/ou anteras durante o desenvolvimento de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5. Estabelecimento da transformação de Arroz e <i>Arabidopsis</i> para teste de função dos genes em estudo.....</b>	<b>58</b>
4.5.1. Arroz cv. Primavera .....	58
4.5.1.1. Efeito da concentração de higromicina no desenvolvimento das unidades embriogênicas de arroz.....	58
4.5.1.2. Análise estatística .....	60
4.5.1.3. Transformação de unidades embriogênicas de arroz.....	61

4.5.2. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura floral de *Brachiaria* sp. **a-** inflorescência terminal composta de racemos (seta). **b-** racemo composto por espiguetas unisseriadas. **c-** flor hermafrodita com três anteras (amarelas) e um pistilo constituído de um ovário (OV) e estigma bifido (seta), e ramificado na extremidade..... 2
- Figura 2 -** Esquema da reprodução sexual e apomítica (apospórica) que ocorre em espécies do gênero *Brachiaria*. CMM: célula-mãe do megásporo, CMP: célula-mãe do grão de pólen. (Reproduzido de Carneiro & Dusi, 2002)..... 6
- Figura 3:** Esquema do vetor binário pGPro1. LB: borda esquerda, 35S term: CaMV35S terminador da transcrição. loxP: sítio de recombinação Cre, hptII: *hygromycin phosphotransferase* II, nos term: terminador da transcrição da *nopaline synthase*, enhanced GFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*, gusA:  $\beta$ -glucuronidase, ORI: origem de replicação, RB: borda direita, nptI: *neomycin phosphotransferase* I (Thilmony et al., 2006)..... 27
- Figura 4:** Esquema do vetor binário pCAMBIA1391Z. MCS: múltiplo sítio de clonagem Higo: *hygromycin phosphotransferase* II (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585> - modificado)..... 28
- Figura 5:** Esquema do vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems* (Invitrogen<sup>TM</sup>) utilizado para clonagem das sequências para preparo das sonda de hibridização in situ, contendo os sítios de iniciação da RNA polimerase T7 e SP6 e sítios de enzimas utilizados para linearização do plasmídeos..... 33
- Figura 6:** Esquema de extensão dos clones 04, 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a*, *BbrizRPL41*, *BbrizMMF* e *BbrizSec13* por 5'RACE e *Genome walking*. A cor azul clara representa o a região 3'UTR (não traduzida) a cor azul escura representa a região codificadora (ORF), a cor rosa representa íntrons e a cor branca representa a região promotora putativa. Dentro das regiões brancas, os traços coloridos representam motivos característicos de: verde - expressão específica em pólen (POLLEN1LELAT52), amarelo - expressão específica em raiz (ROOTMOTIFTAPOX1) e vermelho - relação com a resposta à auxina. O tamanho de cada região é indicado em número de nucleotídeos..... 43
- Figura 7:** RT-qPCR dos clones 04, 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* mostrando sua expressão em ovários, anteras, folhas e raízes de *B. brizantha* apomítica e sexual. Nas abscissas, amostras de cDNA sintetizado a partir de RNA total de ovários em pré antese; anteras em pré-antese; folha jovem; raiz. Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas. Eixo das ordenadas: expressão relativa ao gene de referência *BbrizUBCE* (Silveira et al., 2009)..... 46
- Figura 8:** Expressão relativa dos clones 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* em ovários, anteras, folhas e raízes de arroz cv. Primavera por RT-qPCR. Nas abscissas, amostras de cDNA sintetizado a partir de RNA total de ovários em pré-antese; anteras em pré-antese; folhas jovens e raízes. Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas. Eixo das ordenadas: expressão relativa ao gene de referência UBQ5 (Jain et al., 2006)..... 48
- Figura 9:** Localização da expressão do clone 04 por hibridização in situ em secções

semi-finas de ovários de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha* hibridizadas com sonda senso (b) e anti-senso (b-d) mostrando: **a-** preservação do RNA (laranja) no controle após coloração com laranja de acridina em células do ovário; **b-** ausência de sinal no controle com a sonda senso na sexual na megagametogênese; **c-** na megagametogênese, expressão generalizada no ovário com forte sinal no saco embrionário e tegumento na sexual; **d-** na megagametogênese, sem sinal de hibridização na apomítica. In: tegumento; se: saco embrionário. Barra= 50 µm.....

49

**Figura 10:** Localização da expressão de *BbrizRPS8* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Ovários (a-f, j,k) e anteras (g-i, l) hibridizadas com sonda anti-senso (b-i) e senso (j-l) mostrando: **a-** preservação do RNA (laranja) no controle após coloração com laranja de acridina no citoplasma das células das anteras com a célula mãe do grão de pólen e do ovário com a célula arqueosporial; **b-d** – na megasporogênese, forte sinal no meiócito da apomítica (b) e no ovário com célula arqueosporial (c) e díade (d) da sexual; **e,f-** na megagametogênese, forte sinal de hibridização no saco embrionário, nucelo e tegumentos da apomítica (e) e no saco embrionário, nucelo, tegumentos e antípodas da sexual (f) **g, h-** na microsporogênese, forte sinal em: célula-mãe do grão de pólen, tapete, camada média, endotécio e epiderme da sexual (g) e no meiócito da apomítica (h); **i-** antera madura sem sinal no grão de pólen da apomítica; **j-l-** ausência de sinal no controle com a sonda senso em apomítica na megasporogênese (j); na sexual na megagametogênese (k) e na apomítica na microsporogênese (l). A: antípodas; AC: célula arqueosporial; D: díade; EN: endotécio; EP: epiderme; ES: saco embrionário; IN: tegumento; MC: meiócito; ML: camada média; N: nucelo; PMC: célula mãe do grão de pólen; PG: grão de pólen; T: tapete. Barra b, c, d = 10 µm; a, g, h, j, l = 20 µm; e, f, i, k = 50 µm.....

51

**Figura 11:** Localização da expressão de *BbrizRPL41* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Ovários (a-f, j,k) e anteras (g-i, l) hibridizadas com sonda anti-senso (a-i) e senso (j-l) mostrando: **a-d-** na megasporogênese, hibridização generalizada nos ovários com forte sinal na célula arqueosporial (a) e no meiócito (b) em apomítica e na célula arqueosporial (c) e díade (d) na sexual; **e, f-** na megagametogênese, sinal da hibridização nas células do nucelo e tegumentos, com fraco sinal na oosfera da apomítica (e) e no nucelo, tegumentos e no saco embrionário nas antípodas e aparato da oosfera da sexual (f); **g-i-** na microsporogênese, forte sinal na célula-mãe do grão de pólen, tapete, camada média, endotécio e epiderme (g) e micrósporos uninucleados (h) sem sinal no grão de pólen (i) da sexual; **j-l-** ausência de sinal no controle com a sonda senso em apomítica na megasporogênese (j) e megagametogênese (k) e na sexual na microsporogênese (l). A: antípodas; AC: célula arqueosporial; D: díade; EG: oosfera; EN: endotécio; EP: epiderme; ES: saco embrionário; IN: tegumento; MC: meiócito; M: micrósporo; ML: camada média; N: nucelo; OV: ovário; PMC: célula mãe do grão de pólen; PG: grão de pólen; T: tapete. Barra a, c, d = 10 µm; g, h, j = 20 µm; e, f, i, k = 50 µm.....

53

**Figura 12:** Localização da expressão de *BbrizMMF* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Anteras (a,c,d) e ovários (b) hibridizadas com sonda anti-senso (a,b) e senso (c) mostrando: **a-** na microsporogênese, forte sinal de hibridização nas células-mãe do grão de pólen na sexual; **b-** na megagametogênese, nenhum sinal de hibridização na apomítica; **c-** ausência de sinal no controle com a sonda senso em sexual na

microsporogênese; **d** - ovário e anteras após coloração com laranja de acridina mostrando a preservação do RNA (laranja). in: tegumentos, N: nucelo, PMC: célula mãe do pólen, se: saco embrionário. Barra a,b,d= 50 µm; c= 20 µm..... 54

**Figura 13:** Localização da expressão de *BbrizSec13* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Ovários (a,b) e anteras (b,c,d) hibridizadas com sonda anti-senso (a-c) e senso (d) mostrando: **a**- na megagametogênese, expressão nos tegumentos, nucelo e fraco sinal na oosfera e sinérgide na apomítica; **b, c** – na microsporogênese forte sinal na célula-mãe do grão de pólen da sexual (b) e na apomítica (c); **d** - ausência de sinal no controle com a sonda senso em sexual na microsporogênese. in: tegumentos, N: nucelo, Si: sinérgide, Ov: ovário, os: oosfera, PMC: célula mãe do grão de pólen. Barra a=50 µm ; b, c, d =20 µm ..... 55

**Figura 14:** Unidades embriogênicas de arroz, *Oryza sativa*, cv. Primavera, em meio MSI (meio de seleção I) suplementado com os antibióticos cefotaxima (400 mg/L) e timetina (100 mg/L), submetidos a diferentes concentrações de higromicina. **a**- Placa controle, sem higromicina. **b**- unidades embriogênicas expostas a concentração de 5 mg/L de higromicina. **c** - concentração de 10 mg/L de higromicina. **d** - concentração de 25 mg/L de higromicina. **e** - concentração de 50 mg/L de higromicina. **f** - concentração de 100 mg/L de higromicina..... 60

**Figura 15** – Proporção de explantes mortos segundo as doses do antibiótico higromicina..... 61

**Figura 16:** Expressão do gene *GUS* em calos embriogênicos de arroz cv. Primavera, 24 horas após o bombardeamento de partículas, utilizando as construções: a- pAHC27 (pUbi1::*GUS*) (Christensen et al., 1992), barra= 100 µm. b- pBbrizRPS8::*GUS*, barra= 100 µm. c- pBbrizRPS15a::*GUS*, barra= 50 µm e d – pBbrizRPL41::*GUS*, barra= 100 µm..... 62

**Figura 17:** Eletroforese em gel de agarose 1% apresentando as seqüências amplificadas por PCR das plantas de *A. thaliana* transformadas com pBbrizRPS15a::*GUS* (a-b) e pBbrizRPL41::*GUS* (c-d). As reações foram realizadas com iniciadores pra o gene *GUS* (a e c) e com iniciadores internos aos promotores mais *GUS* (b e d). O número 0 indica a planta não transformada e o símbolo + o controle positivo (plasmídeo), L indica o marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®)..... 63

**Figura 18:** Detecção histoquímica do gene *GUS* em tecido de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com vetor contendo a construção pBbrizRPS15a::*GUS*. a- Flor de *A. thaliana* não transformada; barra= 0,2 mm. b- Flores fechadas de *A. thaliana* em diferentes estádios de desenvolvimento com forte expressão de *GUS*; barra= 0,2 mm. c- Flor aberta de *A. thaliana* com forte expressão de *GUS* nas pétalas e estigma; barra: 0,5 mm. d- Carpelo, evidenciando o estigma com forte expressão; barra= 10 µm. e- antera com forte expressão de *GUS*; barra= 20 µm. f- antera com expressão muito fraca de *GUS*; barra= 10 µm. A: antera, C: carpelo, E: estigma, P: pétala..... 64

**Figura 19:** Detecção histoquímica do gene *GUS* em tecido de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com vetor contendo a construção pBbrizRPL41::*GUS*. a- Flores não transformadas de *A. thaliana*; barra= 0,2 mm. b- Antera isolada de flor de



*A. thaliana* não transformada; barra= 20  $\mu$ m. c- Flor aberta de *A.thaliana* com forte expressão de *GUS* nas pétalas, anteras e parte externa do carpelo; barra= 0,2 mm. d- Flor fechada evidenciando a forte expressão de *GUS* nas anteras; barra= 0,2 mm. e- anteras com expressão de *GUS*; barra=50  $\mu$ m. f- antera com forte expressão de *GUS* nos grãos de pólen; barra=20  $\mu$ m. g- carpelo com parte externa azulada e anteras com baixa expressão; barra= 50  $\mu$ m. h- carpelo de planta transformada sem expressão de *GUS*; barra= 50  $\mu$ m. i- folha de planta não transformada; barra= 0,5 mm. j- folha de planta transformada com expressão de *GUS*; barra= 0,5 mm. A: antera, C: carpelo, F: folha, gp: grão de pólen, P: pétala.....

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação por 5'RACE dos clones 04, 09, 10, <i>Bbriz</i> MMF (F09) e <i>Bbriz</i> SEC13 (H12). AP1 e AP2: iniciadores do adaptador do <i>Marathon</i> <sup>TM</sup> <i>cDNA Amplification Kit</i> (Clontech).....	19
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação das regiões promotoras dos clones 09, 10, 21, <i>Bbriz</i> MMF (F09) e <i>Bbriz</i> SEC13 (H12). AP1 e AP2: iniciadores do adaptador do <i>Genome Walker</i> <sup>TM</sup> <i>Universal Kit</i> (Clontech).....	22
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos iniciadores para os clones 09, 10 e 21 utilizados para amplificação das sequências para clonagem no vetor pGPro2 (Genbank: EU147786) (Thilmony et al., 2006; Thilmony et al., 2009).....	26
<b>Tabela 4:</b> Sequência dos iniciadores para os clones 10 e 21 utilizados para amplificação das sequências para clonagem no vetor pCAMBIA1391Z ( <a href="http://www.cambia.org/daisy/cambia/585">http://www.cambia.org/daisy/cambia/585</a> ).....	27
<b>Tabela 5:</b> Sequência dos iniciadores utilizados para reações de RT-qPCR para os Clones 04, 09,10, 21, <i>Bbriz</i> UBCE (Silveira et al., 2009) e UBQ5 (Jain et al., 2006).....	29
<b>Tabela 6:</b> Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos utilizados para síntese da sonda para hibridização in situ. Clones 04, 09, 21, <i>Bbriz</i> MMF (F09) e <i>Bbriz</i> SEC13 (H12).....	32
<b>Tabela 7:</b> Meios de cultura utilizados para indução e seleção das unidades embriogênicas (UE) de arroz cv. Primavera.....	35
<b>Tabela 8:</b> Análise das sequências dos clones 04, 07 e 10 utilizando o programa BLASTX contra o banco nr (não redundante) de sequências de proteínas do NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST">www.ncbi.nlm.gov/BLAST</a> ) (Altschul et al., 1997).....	41
<b>Tabela 9:</b> Resultados das amplificações das sequências dos clones 04, 07, <i>Bbriz</i> RPS8, <i>Bbriz</i> RPS15a, <i>Bbriz</i> RPL41, <i>Bbriz</i> MMF e <i>Bbriz</i> Sec13 pelas técnicas de 5'RACE e <i>genome walking</i> .....	42
<b>Tabela 10: Tabela 10:</b> Resumo dos resultados da análise de similaridade por BLAST ( <a href="http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST">www.ncbi.nlm.gov/BLAST</a> ) e a análise de expressão por RT-qPCR e hibridização in situ das sequências dos clones 04, 07, <i>Bbriz</i> MMF, <i>Bbriz</i> Sec13, <i>Bbriz</i> RPS8, <i>Bbriz</i> RPS15a e <i>Bbriz</i> RPL41. Apo: apomítica, in situ: hibridização in situ, Sex: sexual, PMC: célula mãe do grão de pólen, qPCR: RT-qPCR.....	57
<b>Tabela 11:</b> Efeito da concentração de higromicina no desenvolvimento de unidades embriogênicas de arroz em meio de indução NB básico. MSI - meio de seleção I, C- cefotaxima, T – timetina. Os números indicam a quantidade de unidades embriogênicas.....	59
<b>Tabela 12:</b> Estimativas das doses letais do antibiótico necessárias para matar 100% dos explantes, segundo o modelo binomial ajustado.....	61

## ABREVIATURAS

2,4D	ácido 2,4 diclorofenoxiacético
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	pares de base
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
GUS	$\beta$ -glucuronidase
IPTG	isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
kV	kilo voltz
LB	Luria Bertani
M	molar
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
PCR	reação em cadeia de polimerase
PCR	reação da polimerase em cadeia
pH	potencial hidrogenionte
psi	libra por polegada quadrada
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
RT	transcriptase reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
TM	temperatura de anelamento de iniciadores
TRIS	tri (hidroximetil) aminometano
U	unidade
X-Gal	5-bromo- 4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo
X-Gluc	ácido 5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-glucurônico
°C	graus Celsius

## RESUMO

*Brachiaria brizantha* é uma gramínea forrageira da família Poaceae, introduzida da África, e amplamente utilizada no Brasil. *Brachiaria* se reproduz de modo sexual ou assexual por apomixia, clonagem de plantas por sementes. O desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para transferência de genes é de grande interesse para os programas de melhoramento desse gênero. As bases moleculares da reprodução ainda não estão bem elucidadas, a formação do gametófito e os principais eventos reprodutivos ocorrem dentro das anteras e ovários, sendo de grande interesse a identificação de genes expressos nesses órgãos e suas regiões regulatórias. Neste trabalho foram escolhidas sete sequências de cDNA de alta expressão em ovários de *Brachiaria*, na megasporogênese e megagametogênese com objetivo de isolar as sequências promotoras desses genes. As regiões codificadoras dos cDNA foram amplificadas de modo a ter essa região completa e conhecer a função inferida em bancos de dados. As sete sequências estudadas tiveram maior expressão em órgãos reprodutivos (ovários e anteras) e raízes quando comparada a folhas. Transcritos desses genes foram localizados em diferentes tecidos de ovários e anteras. A região codificadora completa e a região promotora putativa foram obtidas para *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*, nomeados neste trabalho em função da similaridade com os genes codificadores de proteínas ribossomais correspondentes. A expressão de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* foi observada em células mitoticamente ativas, em tecidos em crescimento do óvulo, anteras e raízes, consistente com a expressão de genes que codificam proteínas ribossomais em outras plantas, sugerindo envolvimento desses genes em atividades gerais de regulação do crescimento e desenvolvimento de órgãos reprodutivos e raízes, independentemente do modo de reprodução. As regiões promotoras putativas de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* foram capazes de dirigir a expressão transiente do gene repórter *GUS* em unidades embriogênicas de arroz e flores de *Arabidopsis thaliana* e poderão ser utilizadas em futuras análises de expressão de genes de interesse em órgãos reprodutivos.

**Palavras chaves:** *Brachiaria brizantha*, órgãos reprodutivos, promotores, transformação genética

## ABSTRACT

*Brachiaria brizantha* is a forage grass of the Poaceae family, introduced from Africa and largely used in Brazil. *Brachiaria* reproduces sexually or asexually by apomixis, an asexual mode of reproduction through seeds. The development of biotechnological tools for gene transfer is being researched to support the breeding programs on this genus. The molecular bases of reproduction have not yet been fully elucidated, however it is known that gametophyte formation and main reproductive events occur inside the anthers and ovaries. There is therefore much interest in identifying expressed genes and their corresponding upstream regulatory sequences in these organs. In this work seven cDNA sequences with higher expression in ovaries of *Brachiaria* at megasporogenesis and megagametogenesis were chosen in order to isolate the corresponding promoter sequences. The open read frame (ORF) of cDNAs were amplified and their function inferred in databases. The seven sequences studied had higher expression in reproductive organs (ovaries and anthers) and roots compared to leaves. Transcripts of these genes were located in different tissues of ovaries and anthers. The complete coding region and putative promoter region were obtained for clones *BbrizRPS8*, and *BbrizRPS15a* *BbrizRPL41* as nominated in this work due to their similarities with corresponding genes encoding ribosomal proteins. The expression of *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* and *BbrizRPL41* was observed in mitotically active cells, in growing ovule, anthers and roots, consistent with the expression of genes encoding ribosomal proteins in other plants, suggesting that these genes could be involved in general activities regulating growth and development of reproductive organs and roots, irrespective of the mode of reproduction. The putative promoter regions of *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* and *BbrizRPL41* were able to drive transient expression of the reporter gene *GUS* in the embryogenic units of rice and *Arabidopsis thaliana* flowers and may be used for future analysis of expression of genes in reproductive organs.

**Keywords:** *Brachiaria brizantha*, reproductive organs, promoters, genetic transformation

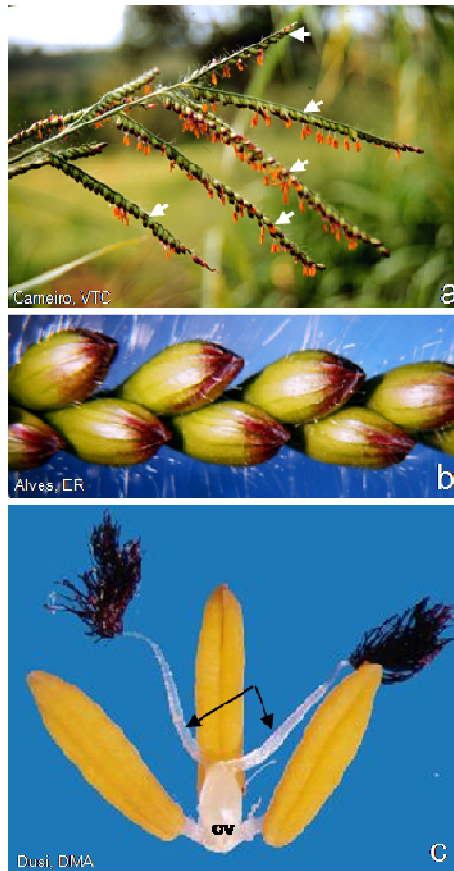
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Brachiaria*

O gênero *Brachiaria* faz parte da família Poaceae que pertence a ordem Poales do clado Monocotyledonae. Esta classificação é organizada desde a primeira publicação do Grupo de Filogenia das Angiospermas em 1998 (APG I, 1998) até a última revisão em 2009 (Chase et al., 2009).

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

*Brachiaria* é uma espécie herbácea, com inflorescências terminais do tipo panícula, composta por racemos sustentando espiguetas solitárias uniseriadas (Fig. 1). É um gênero de gramíneas proveniente da África, que foi introduzido na América do Sul no século XVIII, com cerca de 100 espécies descritas em regiões tropicais e subtropicais (Miles et al., 1996). É amplamente utilizada no Brasil como forrageira devido a sua fácil adaptação a diferentes solos, sendo cultivada em área de 30 a 70 milhões de hectares, sendo que 85% desse total são compostos por apenas duas variedades, *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk (Syn. *Urochloa decumbens* cv. Basilisk) e *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Syn. *Urochloa brizantha* cv. Marandu) (Miles et al., 1996).



**Figura 1:** Estrutura floral de *Brachiaria* sp. **a-** inflorescência terminal composta de racemos (seta). **b-** racemo composto por espiguetas unisseriadas. **c-** flor hermafrodita com três anteras (amarelas) e um pistilo constituído de um ovário (OV) e estigma bifido (seta), e ramificado na extremidade.

*B. brizantha* cv. Marandu, popularmente conhecida como Braquiarão ou Brizantão, é a forrageira mais plantada no Brasil desde a década de 80 e vem dominando o mercado interno de sementes e de exportação. ([http://www.abrasem.com.br/materia\\_tecnica/2004/0008\\_parceria\\_embrapa\\_unipastos.htm](http://www.abrasem.com.br/materia_tecnica/2004/0008_parceria_embrapa_unipastos.htm)).

O uso de *Brachiaria* como pastagens está relacionado a características como fácil adaptação a diferentes solos ácidos e pobres, resistência a seca e a pragas e boa qualidade nutricional para alimentação bovina (Lapointe et al., 1992; Keller-Grein et al., 1996). O Brasil tem um rebanho bovino comercial estimado em 2010 de aproximadamente 205 milhões de cabeças (IBGE, 2010) e a criação do gado de corte depende da criação do rebanho em pasto (Valle et al., 2004b) movimentando em torno de R\$ 12 bilhões (Polaquini et al., 2006).

### 1.1.1. Reprodução em *Brachiaria*

Em *Brachiaria* a apomixia, reprodução assexual por meio de sementes, é predominante, principalmente nas variedades comerciais (Dusi et al., 1999). A apomixia em *Brachiaria* ocorre por aposporia, com plantas apresentando o megagametófito, saco embrionário, do tipo Panicum. O endosperma se desenvolve por pseudogamia (Valle, 1991; Alves et al., 2001).

Em plantas de *B. brizantha* (Araújo et al., 2000) e *B. decumbens* (Dusi et al., 1999) foram observadas diferenças no desenvolvimento do saco embrionário entre o acesso sexual e apomítico. Em *B. brizantha* o aparecimento das iniciais apospóricas (AIs) (Araújo et al., 2000) ocorre em estágio posterior a *B. decumbens* (Dusi et al., 1999). Enquanto em *B. brizantha* o aparecimento das AIs se dá quando o megásporo já está presente no óvulo (Araújo et al., 2000), em *B. decumbens* as AIs já estão presentes no nucelo na fase de meiócito (Dusi et al., 1999).

Em *B. brizantha* os estádios I e II são relativos à megasporogênese e os estádios III e IV relativos à megagametogênese, sendo caracterizados pelos seguintes eventos (Araújo et al., 2000):

estádio I - presença de células nucleares circundando a célula mãe do megásporo (MMC), nas plantas sexuais e apomíticas;

estádio II - presença das células iniciais do saco embrionário, iniciais apospóricas nas plantas apomíticas e megásporos do saco embrionário mitótico;

estádio III - presença do saco embrionário imaturo, três ou cinco sacos embrionários imaturos nas plantas apomíticas e apenas um saco do tipo Polygonum no início do desenvolvimento em plantas de reprodução sexual;

estádio IV - presença de saco embrionário maduro, tipo Panicum, apresenta duas sinérgides, a oosfera, o núcleo polar e não é observada a presença de antípodas nas plantas apomíticas e o saco embrionário tipo Polygonum nas plantas sexuais.

Em plantas sexuais o saco embrionário é do tipo *Polygonum* e apresenta um número variável de antípodas, de três a nove, sendo diferente das três antípodas observadas normalmente em outras espécies (Araújo et al., 2000). Os acessos sexuais de *Brachiaria* são considerados pouco férteis (Valle et al., 1996), mesmo ocorrendo desenvolvimento floral e comportamento reprodutivo normal, foi observado um grande número de sementes abortadas, limitando a sua produção. O aborto dessas sementes pode ser causado pela sua gradual rejeição ao longo do desenvolvimento. Isso é uma



característica de depressão por endogamia, onde ocorre o acúmulo de alelos recessivos deletérios devido ao cruzamento de indivíduos aparentados (Araújo et al., 2007).

### **1.1.2. Melhoramento genético em *Brachiaria***

No gênero *Brachiaria* é observada diferença de ploidia entre os acessos sexuais e apomíticos, sendo a poliploidia associada à apomixia (Carman, 1997). Em *Brachiaria* o número de básico cromossomos é 9, sendo os tetraplóides apomíticos ( $2n=4X=36$ ) dominantes, enquanto os diplóides naturais de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* são sexuais. As principais variedades de importância econômica são apomíticas e poliplóides, *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. mutica* são tetraplóides e *B. humidicola* hexaplóide (Valle et al., 2004a).

A diferença de ploidia e os dois diferentes tipos de reprodução observados na mesma espécie são entraves nos programas de melhoramento de *Brachiaria* (Valle et al., 2004b). A planta apomítica só pode ser usada com doadora de pólen nos cruzamentos com plantas sexuais. A duplicação cromossômica por colchicina de plantas sexuais diplóides de *B. brizantha*, produziram plantas tetraplóides sem alteração no modo de reprodução após tratamento com colchicina (Pinheiro et al., 2000; Araujo et al., 2005). Essas plantas estão sendo utilizadas para geração de híbridos intraespecíficos.

As cultivares de *Brachiaria* utilizadas comercialmente como forrageira possuem base genética estreita, cada uma delas apresentando diferentes características de interesse agrônomo: *B. decumbens* cv. Basilik é susceptível à cigarrinha-das-pastagens; *B. humidicola* é bem adaptada a solos mal drenados, mas possui menor valor nutritivo e tolerância à cigarrinha-das-pastagens. *B. brizantha* cv. Marandu é resistente a esse inseto, mas susceptível a Rhizoctonia e menos tolerante a solos ácidos e pobres. O programa de melhoramento tem como objetivo a obtenção de híbridos que reúnam características como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e resistência à cigarrinha-das-pastagens de interesse (Valle et al., 2004a). Devido à dificuldade de obtenção desses híbridos por cruzamentos interespecíficos o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para transferência de genes é de grande interesse para os programas de melhoramento de *Brachiaria*.

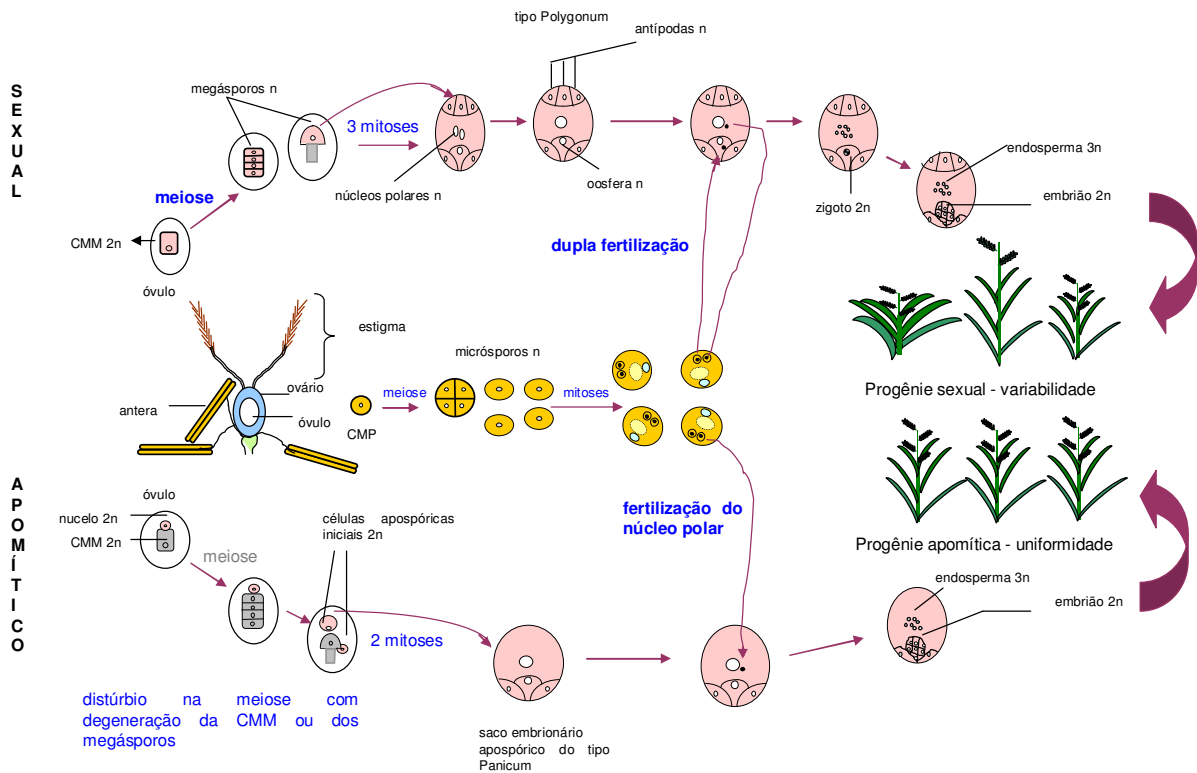
## 1.2. Apomixia

A reprodução na maioria das angiospermas pode ser exclusivamente pela via sexual, ou em combinação com a reprodução assexual. A apomixia, produção de clones de plantas por sementes, é um tipo de reprodução assexual onde ocorre a formação do embrião sem a fertilização de oosfera não reduzida (Asker et al., 1992). Como ocorre em *Brachiaria* (Miles et al., 1996), gramíneas com *Paspalum* (Quarin et al., 2001), *Pennisetum* (Dujardin et al., 1984) e *Panicum* (Savidan, 1982) também apresentam espécies com modo de reprodução sexual e apomítico.

### 1.2.1. Tipos de apomixia

A apomixia pode ser classificada em embrionia adventícia de natureza esporofítica ou apomixia gametofítica de acordo com a origem do embrião apomítico (Nogler, 1984).

Na embrionia adventícia a formação e maturação do saco embrionário meiótico ocorrem da mesma forma que nas plantas sexuais, os embriões são formados diretamente de células somáticas individuais do nucelo ou do tegumento interno do óvulo (Asker et al., 1992; Carneiro et al., 2004b). A apomixia gametofítica é caracterizada pela formação de um saco embrionário não reduzido (Nogler, 1984) sendo classificada em diplosporia ou aposporia de acordo com a origem do saco embrionário não reduzido. Na diplosporia o saco embrionário é desenvolvido da célula-mãe do megásporo em decorrência de distúrbio na meiose apresentando oito núcleos não reduzidos, sendo morfológicamente semelhante àqueles encontrados em plantas sexuais. Na aposporia, células do nucelo denominadas iniciais apospóricas, entram em mitose diretamente e formam sacos embrionários não reduzidos que podem ser do tipo *Hieracium*, com oito núcleos em uma disposição bipolarizada, ou do tipo *Panicum* com quatro núcleos dispostos em um mesmo pólo (a oosfera, um núcleo polar e duas sinérgides) (Nogler, 1984; Carneiro et al., 2004b) (Fig. 2). O desenvolvimento do endosperma em plantas apomíticas pode ocorrer de forma autônoma, sem a fertilização do núcleo polar ou por pseudogamia quando ocorre a fertilização do núcleo polar pelo núcleo espermático (Nogler, 1984).



**Figura 2** - Esquema da reprodução sexual e apomítica (apospórica) que ocorre em espécies do gênero *Brachiaria*. CMM: célula-mãe do megásporo, CMP: célula-mãe do grão de pólen. (Reproduzido de Carneiro & Dusi, 2002).

### 1.2.2. Controle genético da apomixia

Na maioria das espécies estudadas, como *Penisetum*, *Panicum*, *Brachiaria*, a herança genética da apomixia gametofítica tem sido associada à transferência de um único locus ou de um pequeno número de loci (Bicknell et al., 2004). Em *Paspalum notatum* a aposporia parece ser determinada por um único gene dominante sendo herdada como um fator simples e dominante (Martínez et al., 2001), estando presente em uma região genômica que não sofre recombinação (Stein et al., 2004). Em *Hieracium* três fatores dominantes não ligados seriam necessários para o controle da apomixia (Bicknell et al., 2004). Em *Poa pratensis* seriam necessários cinco genes para a formação assexual da semente, que seriam genes de iniciação (Aiv) e prevenção (Apv) da aposporia, um gene responsável pelo desenvolvimetro do megásporo (Mdv) e genes responsáveis pela iniciação (Pit) e prevenção da partenogênese (Ppv), a interação e a expressão desses genes seria responsável pela variação do modo de reprodução (Matzk et al., 2005).

Em *Brachiaria*, análises de segregação e análises com marcadores moleculares em híbridos interespecíficos mostram que um único e dominante locus controla a apomixia sendo responsável pela aposporia (Valle et al., 1994; Pessino et al., 1997).

### **1.2.3. Interesse no estudo da apomixia**

Em espécies naturalmente apomíticas como *Brachiaria* a quebra da apomixia pode permitir a introdução de novas características de interesse agrônomico por cruzamento e aumentar a variabilidade genética nessas plantas.

Já em cultivares de importância agrônômica, como arroz e trigo, o uso controlado da apomixia permitirá a produção de populações geneticamente uniformes fixando genótipos elite e híbridos de qualidade, sendo possível propagá-los por sementes (Carneiro et al., 2002; Bicknell et al., 2004) que poderão ser produzidas por muitas gerações sem perder o vigor ou ter alteração de genótipo (Koltunow et al., 1995) gerando redução dos custos de produção.

Além disso, a introdução da apomixia em plantas que se propagam vegetativamente pode propiciar sua propagação por meio de sementes, produzindo material sem contaminação por vírus, viróides e micoplasmas e trazer benefícios como o menor custo e a alta produção (Spillane et al., 2004).

*Brachiaria* pode ser considerada um importante sistema para estudos de expressão de genes associados à reprodução (Rodrigues et al., 2003; Silveira et al., 2012) devido à presença de reprodução apomítica e sexual dentro da mesma espécie, como em *B. brizantha* (Araújo et al., 2000).

### **1.3. Identificação de seqüências de cDNA específicas de ovário**

Em geral, as bases moleculares da reprodução ainda não estão totalmente elucidadas (Armenta-Medina et al., 2011). A formação do gametófito e os principais eventos reprodutivos ocorrem dentro dos ovários, por isso há um grande interesse em estudar seqüências de expressão neste órgão. Genes de expressão em ovário são amplamente descritos em *Arabidopsis*. Nessa espécie, Yu et al. (2005) e Johnston et al. (2007) utilizando a técnica de microarranjo identificaram um grande número de genes específicos ou preferencialmente expressos no gametófito feminino (saco embrionário). Para validação da expressão espacial de alguns destes genes, experimentos de hibridização *in situ* foram realizados e seus promotores foram fusionados com o gene

marcador *gus* mostrando expressão específica no gametófito feminino. Genes envolvidos na microsporogênese e megagametogênese, *SPOROXYLESS* (*SPL*) e *NOZZLE* (*NZZ*) foram identificados em *Arabidopsis* (Schieffhale et al., 1999; Yang et al., 1999). Em *Zea mays* foi identificado o gene *ZmEAI* com seqüências homólogas presentes apenas em monocotiledôneas, indicando ser um possível gene específico de gramínea. Esse gene apresentou expressão exclusiva em células do aparato da oosfera antes da fertilização (Marton et al., 2005). Um grande número de genes expressos em oosfera e sinérgides de arroz foi identificado e caracterizado, as análises sugerem que mecanismos de regulação epigenética e pós-transcricional estão envolvidos na especificação e/ou manutenção dessas células (Ohnishi et al., 2011).

Vários genes de expressão em ovários e relacionados à apomixia são descritos. O gene *ASG-1* (*apomixis-specific gene-1*), de expressão verificada por hibridização *in situ* nas células iniciais apospóricas, foi identificado em *Panicum maximum*, com mesmo padrão de expressão em *Paspalum notatum*, ambas apomíticas facultativas. Em plantas sexuais e apomíticas, foi verificada sua expressão durante a microsporogênese e durante os estágios iniciais de formação do embrião (Chen et al., 2005). Em *Pennisetum ciliare* experimentos com biblioteca subtrativa de cDNA identificaram no estágio de esporogênese, dois transcritos, sendo um de expressão preferencial - *Pca21* e ou outro de expressão específica - *Pca24* em ovários de plantas apomíticas (Singh et al., 2007), sendo que ambos expressos em núcleos em divisão no saco embrionário de ovários de plantas apomíticas. Em *Poa pratensis* foram isolados e caracterizados dois genes, *SERK* e *APOSTART*, envolvidos no desenvolvimento reprodutivo (Albertini et al., 2005).

Em *B. brizantha*, Rodrigues et al. (2003) identificaram 11 fragmentos de cDNA diferencialmente expressos em ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual, nos estágios de megasporogênese e megagametogênese, sendo seis provenientes de ovários de plantas apomíticas, dois de plantas sexuais e três de apomíticas e sexuais mas em diferentes estágios de desenvolvimento. Alves et al. (2007) reportaram o padrão de expressão espacial e temporal de três dessas seqüências, *BbrizMYO*, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK* durante o desenvolvimento do ovário de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*, confirmando o padrão diferencial de expressão entre os dois tipos de reprodução, sugerindo papel durante o desenvolvimento de ovários das plantas apomíticas. Em trabalho de dissertação de mestrado, três seqüências isoladas por Rodrigues et al. (2003) com forte expressão em ovários, clones 04, 09 e 21, foram

caracterizadas como de expressão preferencial em ovários por *northern* reverso (Lacerda, 2007). Silveira (2009) identificou em experimentos de macroarranjo e RT-qPCR onze sequências com expressão diferencial entre ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual.

Neste trabalho foram caracterizadas sequências de cDNA isoladas de ovários de *B. brizantha*. Cinco sequências foram identificadas por Rodrigues et al. (2003), com forte expressão nos ovários independente do modo de reprodução. Dentre essas, os clones 09 e 21, foram previamente analisados e apresentaram similaridade com genes que codificam as proteínas ribossomais RPS8 e RPL41, respectivamente (Lacerda, 2007).

Além dos clones citados acima, utilizamos os clones *BbrizMMF* e *BbrizSec13* que foram previamente caracterizados por Silveira (2009), sendo ambos oriundos da biblioteca de cDNA de *B. brizantha*. Estes clones foram selecionados em experimento de macroarranjo por apresentarem diferença de expressão significativa entre ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual. O clone *BbrizMMF* apresentou similaridade com Fator de manutenção do cromossomo de *Triticum aestivum* e o *BbrizSec13* com Proteína putativa do tipo Sec13 de *Oryza sativa* (japonica cultivar group) (Silveira, 2009).

#### **1.4. Proteínas ribossomais**

Três sequências estudadas neste trabalho foram identificadas anteriormente como de alta expressão em ovários (Rodrigues et al., 2003) e apresentaram similaridade com proteínas ribossomais sendo nomeadas, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* em relação à função atribuída em bancos de dados ([www.ncbi.nlm.gov/](http://www.ncbi.nlm.gov/) BLAST) (Altschul et al., 1997).

Proteínas ribossomais são conhecidas por estarem envolvidas na síntese e processamento de proteínas, participarem do balanço da síntese do RNA e serem componentes estruturais dos ribossomos (Wool, 1996). Recentemente, foi sugerido que genes que codificam proteínas ribossomais não devem ser apenas considerados como genes constitutivos, porque muitos deles estão envolvidos em funções extraribossomais, como identificação de estresse nuclear e identificação de síntese de ribossomos aberrantes levando a apoptose celular (McIntosh et al., 2006; Warner et al., 2009). Mutações em genes que codificam proteínas ribossomais sugerem que eles possuem papel regulatório no desenvolvimento de plantas e animais (Byrne, 2009).

Análise de abundância de transcritos de uma família de genes que codificam proteínas ribossomais em *Arabidopsis thaliana* apresentaram alta expressão em tecidos reprodutivos (Hulm et al., 2005; Shi et al., 2011). Em análise de transcriptoma de tecidos reprodutivos de *Brassica napus*, micrósporos e óvulos mostraram alta fração de genes que codificam proteínas ribossomais quando comparados com pólen (Whittle et al., 2009a). Algumas proteínas ribossomais parecem estar relacionadas com o desenvolvimento da planta. Mutação semi-dominante no gene RPS5 de *Arabidopsis* causa retardo no crescimento, defeitos florais e vasculares e letalidade do embrião (Weijers et al., 2001). Silenciamento da proteína S27a induz alterações morfológicas em pétalas e desenvolvimento anormal nos estames e óvulos, sendo a sua superexpressão relacionada com o aumento da proliferação de células não diferenciadas (Hanania et al., 2009). Estudos recentes sugerem que atividades nucleolares, como a biogênese de RNA e de ribossomos, são cruciais para a progressão do ciclo celular durante o desenvolvimento do gametófito feminino e desenvolvimento do embrião em *Arabidopsis* (Shi et al., 2011). Juntos, esses dados mostram que genes ribossomais são regulados durante o desenvolvimento e podem ter papel putativo no desenvolvimento reprodutivo.

### **1.5. Estudo de promotores**

A transformação genética em plantas permite a transferência de genes para o genoma de uma planta, independente da compatibilidade sexual esses genes podem ser provenientes de qualquer outra planta, ou mesmo de animais ou microrganismos, oferecendo a possibilidade de obtenção de plantas com características de interesse agrônomico (Carneiro et al., 2004a).

A estrutura dos genes em eucariotos é constituída de éxons, região codificadora, e íntrons, regiões não codificadoras encontradas entre os éxons. Na região 5' a montante ao gene é encontrado o promotor, sequência de DNA que possui sequências regulatórias específicas reconhecidas por proteínas envolvidas na iniciação da transcrição (Lodish et al., 2002).

Para a introdução e a expressão de genes de um modo eficiente em plantas por técnicas de engenharia genética a identificação de promotores capazes de induzir a alta expressão do gene de interesse é fundamental para a eficiência na transformação de plantas.

Os promotores comumente usados para expressão constitutiva, ou seja, capazes de dirigir alta expressão em todas as partes das plantas são aqueles isolados de fontes virais como o promotor do RNA 35S CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), CsVMV (*Cassava vein mosaic virus*) e FMV (*Figwort mosaic virus*), e os promotores endógenos isolados de plantas, como os derivados de ubiquitina e actina (Burke et al., 1988; McElroy et al., 1990; Christensen et al., 1992; Yong-Qiang et al., 1996). A expressão constitutiva nem sempre é desejada, uma sequência super-expressa em células/tecidos no momento ou no local onde não era normalmente expressa pode acarretar problemas no crescimento e desenvolvimento da planta (Potenza et al., 2004).

Promotores para o direcionamento de expressão de genes em locais, e em tipos celulares específicos da planta, estão sendo cada vez mais estudados, podendo agregar características em novos cultivares sem interferir com o processo normal de desenvolvimento da planta proporcionando um refinamento da expressão gênica. Por exemplo, o promotor de glutelina de arroz com expressão em endosperma foi utilizado para dirigir a expressão de genes para produção de carotenóides em grãos de arroz, *Golden Rice* (Paine et al., 2005). Em tomate, o promotor de *polygalacturonase* com expressão específica em fruto foi utilizado para expressão de uma enzima bacteriana “bacterial phytoene synthase” (*crtB* de *E. uredoovora*) para aumentar a produção de licopeno no fruto (Fraser et al., 2002).

Promotores nem sempre possuem a mesma eficiência quando usados em sistemas heterólogos, pois podem possuir elementos *cis*-regulatórios diferentes (Potenza et al., 2004). A atividade do promotor pode ser menor que a esperada e a expressão do gene de interesse às vezes detectado em outros tecidos ou órgãos. Algumas sequências regulatórias necessárias para regulação da expressão se encontram fora do promotor (Swapna et al., 2011). Por isso a importância de se isolar promotores para espécie a ser estudada.

Dentro do mesmo clado, monocotiledôneas ou eudicotiledôneas, é maior a possibilidade de haver uma similaridade de eficiência de promotores. Em *Brachiaria brizantha* foi avaliada (Silveira et al., 2003) a eficiência dos promotores Act1 de *Oryza sativa* (McElroy et al., 1990), Act2 de *Arabidopsis thaliana* (Yong-Qiang et al., 1996), Ubi1 de *Zea mays* (Christensen et al., 1992), Ubi3 de *A. thaliana* (Burke et al., 1988), CaMV35S (*Cauliflower mosaic virus*) (Guilley et al., 1982) e CVMVp (*Cassava vein mosaic virus*) (Verdaguer et al., 1996) baseada na detecção da expressão transiente do



gene repórter *GUS*. Os melhores resultados de expressão de *GUS* em embriões submetidos à biobalística foram obtidos com os promotores Act1 e Ubi1, ambos de monocotiledôneas, e a baixa eficiência do CaMV35S foi evidenciada em *Brachiaria*. Este promotor viral, em geral, é altamente eficiente em dicotiledôneas.

Promotores de genes de expressão específica em órgãos reprodutivos de *Brachiaria* são de grande interesse para estudos dos genes envolvidos na reprodução sexual e apomítica. Podem permitir análises de função destes genes por super-expressão em ovários ou por silenciamento.

Para os testes de direcionamento de expressão com promotores, um sistema eficiente de transformação genética deve estar desenvolvido. Em *B. brizantha* esse sistema ainda não está totalmente estabelecido (Lenis-Manzano et al., 2010; Lacerda, 2007; Cabral et al., 2011), por isso, há o interesse no uso de plantas modelo, para teste do direcionamento da expressão de genes repórteres sob controle destes promotores.

### **1.5.1. Transformação de plantas modelos - *Arabidopsis* e Arroz**

#### **1.5.1.1. *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* é uma eudicotiledônea, membro da família Brassicaceae, e como modelo oferece grandes vantagens para pesquisa na área de genética e biologia molecular e vem sendo amplamente utilizada como modelo de estudo. Ela possui um ciclo de vida curto (6 a 8 semanas), grande produção de sementes. É uma planta diplóide com um genoma pequeno (114.5 Mb/125 Mb total) com apenas cinco cromossomos, de seqüência totalmente conhecida e bem caracterizada. Protocolos de transformação genética estão estabelecidos podendo ser facilmente transformada por *Agrobacterium tumefaciens*, além de haver coleções com grande variedade de mutantes que podem ser usados para identificar e isolar genes envolvidos na reprodução (TAIR website). *A. thaliana* foi utilizada em nosso trabalho para análise de promotores após fusão com o gene repórter *GUS*.

#### **1.5.1.2. Arroz**

Arroz, *Oryza sativa* L., monocotiledônea da família Poaceae (Gramineae) mesma família de *Brachiaria*, é uma importante cultura, constituindo alimento básico para cerca de três bilhões de pessoas. Mais de 150 milhões de hectares são plantados anualmente e a produção mundial de arroz é próxima de 600 milhões de toneladas

(Delseny et al., 2001). Além da importância agronômica, atualmente é usado como modelo em monocotiledôneas. O arroz é uma planta diplóide com o genoma estimado em 389Mb, composto por 12 cromossomos (International Rice Genome Sequencing Project, 2005). Vários genomas de arroz estão sequenciados e disponíveis, permitindo a identificação de genes de interesse por ferramentas genômicas. Além disso, eficientes métodos de transformação genética via *Agrobacterium* (Shimamoto et al., 2002) e por biobalística (Christou, 1997) já estão estabelecidos, para produção de plantas transgênicas. Neste trabalho foi utilizado o arroz cultivar Primavera, desenvolvido pela Embrapa Arroz e Feijão, em 1987. Esse cultivar é adaptado para cultivo em sistema de sequeiro e possui alto potencial produtivo (Soares, 2001).

## **2. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi caracterizar sequências de DNA com alta expressão em tecidos reprodutivos de planta apomítica e sexual, independente do modo de reprodução, e identificar suas regiões promotoras, visando o estudo do padrão de expressão dessas sequências e a utilização desses promotores para o direcionamento de genes de interesse para ovários de *Brachiaria brizantha*.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Identificação de sequências de DNA de expressão preferencial em órgãos reprodutivos de *B. brizantha*.
- Localização espacial dos transcritos, em ovários e anteras, das sequências de expressão preferencial em órgãos reprodutivos de *B. brizantha* apomítica e sexual.
- Identificação das regiões promotoras de genes com alta expressão em tecidos reprodutivos de *Brachiaria brizantha*.
- Validação das regiões promotoras putativas isoladas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

Plantas de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf cv. Marandu apomítica tetraplóide, BRA 000591, e do acesso sexual diplóide, BRA 002747, foram cultivadas no campo na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF.

Ovários, anteras e folhas foram coletados das plantas apomíticas e sexuais cultivadas no campo e as raízes foram coletadas de plantas apomíticas e sexuais cultivadas em casa de vegetação para extração de RNA.

Plantas de *Oryza sativa* L., arroz, cv. Primavera foram crescidas em casa de vegetação. Dessas plantas foram coletados ovários, folhas, anteras e raízes. A cultivar Primavera foi desenvolvido pela Embrapa Arroz e Feijão por meio de cruzamento realizado entre as linhagens IRAT 10 e a LS 85-158, em 1987, tendo como pedigree a denominação CNAx 3608-6-1-2-1, de código CNA8070 (Soares, 2001).

*Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia foi usada nos experimentos de teste dos promotores. As plantas foram crescidas em sala de crescimento com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ , em fotoperíodo de 12 horas.

#### **3.2.1. Extração de ovários e anteras**

Os ovários e anteras de *B. brizantha* cv. Marandu foram extraídos nos estádios de desenvolvimento relativos à megasporogênese, estádios I e II, e megagametogênese, estádios III e IV, como descrito por Araújo et al., (2000). Os ovários e anteras de arroz foram coletados em estágio anterior à antese. Ovários e anteras foram excisados dos pistilos sob microscópio estereoscópico Zeiss-Stemi SV11, armazenados em tubos de microcentrífuga em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cada tubo continha 250 ovários ou 250 anteras.

#### **3.2.2. Extração de RNA de ovários e anteras**

Em tubo de microcentrífuga contendo 250 ovários ou anteras foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen), e os ovários macerados por 30 segundos com pistilo de polietileno com o auxílio de broca AD1-18 s *Bionic Drill set*. Foram adicionados ao macerado 25  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo clorofórmio 100% e álcool isoamílico 100% (24:1; v/v). O material foi agitado em agitador de tubos tipo Vortex

por 30 segundos e incubado no gelo por 5 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo novo, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol para precipitação do RNA. O material foi incubado a 4°C por 30 minutos e centrifugado a 13.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5417R, por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. Seguiu-se nova centrifugação de 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA ressuspensionado em um volume de 20 µL de água tratada com DEPC (DEPC 0,1%) e autoclavada.

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1.0% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0). A quantidade assim como a pureza foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

### **3.2.3. Extração de RNA de folhas e raízes**

RNA foi extraído, pelo método de extração por fenol (Berger, 1987), de folhas jovens e raízes de *B.brizantha* e arroz cv. Primavera coletadas e congeladas em N<sub>2</sub> líquido. Cerca de 2 g de tecido foram macerados em cadinho, livre de RNase, com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino. Ao macerado foram adicionados 6 mL de fenol ácido: clorofórmio: álcool isoamílico, 25:24:1 (v/v/v) e 9 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS 1%) em tubo de centrífuga. O tubo contendo o macerado foi agitado vigorosamente por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5810R por 10 minutos. A partir desse ponto, os tubos foram mantidos sempre no gelo. A fase aquosa foi transferida para tubo novo onde foram adicionados 10% do volume de acetato de sódio 3 M pH 4,5 e 2 volumes de etanol absoluto a -20°C. O material foi incubado a -20°C por 2 horas e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos no gelo. O sedimento foi dissolvido em 2,5 mL de água tratada com DEPC gelada, onde foram adicionados 2,5 mL de cloreto de lítio 4 M, e incubado a 4°C durante a noite. Em seguida, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 1,8 mL de água tratada com DEPC. O RNA foi precipitado em 200

μL de acetato de sódio 3 M e 4 mL de etanol absoluto a -20°C por 1 hora, centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos, e lavado com 5 mL de etanol 70% após descarte do sobrenadante. O RNA foi então centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos, o etanol descartado, e ressuspendido em 200 μL de água tratada com DEPC 0,1% gelada.

A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 μg/mL em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0). A quantidade assim como a pureza foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

### **3.3. Amplificação dos terminais dos cDNAs por 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*)**

#### **3.3.1. Purificação de mRNA de ovários de *B. brizantha***

RNA total de ovários dos estádios I, II e IV foram usados para purificação de mRNA, utilizando o *Kit Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub>*, seguindo instruções do fabricante Dynal®.

RNA (50 - 75 μg em um volume final de 100 μL) foi aquecido a 65°C por 2 minutos e foram adicionados 200 μL de suspensão de *Dynabeads®* previamente lavada com tampão de ligação 2X e o sistema mantido por 5 minutos à temperatura ambiente invertendo o tubo vagarosamente. A solução contendo o RNA foi colocada no MPC (concentrador magnético de partículas - Dynal®) por 30 segundos, até a solução ficar clara. O sobrenadante foi retirado e os *beads* foram lavados com 220 μL de tampão de lavagem B. O tubo foi colocado novamente no MPC e o sobrenadante retirado. Esse passo foi repetido mais uma vez. Após as lavagens, o RNA foi eluído em 6 μL de Tris-HCl pH 7.5 livre de RNase e aquecido a 80°C por 2 minutos e o tubo foi colocado imediatamente no MPC por 30 segundos para coletar o sobrenadante, que contém o mRNA que foi armazenado a -80°C.

#### **3.3.2. Síntese da primeira fita de cDNA**

cDNA foi sintetizado utilizando o *Marathon™ cDNA Amplification Kit*, seguindo as instruções do fabricante. Em um tubo foram adicionados 3 μL (~ 2 μg) de mRNA, 1 μL de iniciador para síntese de cDNA (CDS – 10 μM) e água estéril para completar o volume de 6 μL, que foi centrifugado rapidamente e incubado a 70°C por 2 minutos, e em seguida colocado no gelo por 2 minutos. Após a incubação no gelo foram

adicionados: 2  $\mu\text{L}$  de tampão para a primeira fita 5X, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPmix (10 mM), e 1  $\mu\text{L}$  (20 U) da enzima AMV transcriptase reversa e o volume completado para 10  $\mu\text{L}$  com água. A reação foi misturada usando pipeta, centrifugada rapidamente e incubada a 42°C por 1 hora e colocada no gelo para parar a reação.

### **3.3.3. Síntese da segunda fita de cDNA**

Foram usados 10  $\mu\text{L}$  da reação da primeira fita de cDNA aos quais foram adicionados 16  $\mu\text{L}$  de tampão para a segunda fita 5X, 1,6  $\mu\text{L}$  de dNTPmix (10 mM), 4  $\mu\text{L}$  do coquetel da enzima para a síntese da segunda fita 20X e água estéril para completar o volume de 50  $\mu\text{L}$ . Essa reação foi misturada com pipeta, centrifugada rapidamente (*spin*) em centrífuga Eppendorf 5415C, e incubada a 16°C por 1 hora e meia. Após a incubação foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  (10U) da enzima T4 DNA polimerase seguido de uma nova incubação a 16°C por 45 minutos. Foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  de uma solução de EDTA/ glicogênio para parar a reação.

Para limpeza do cDNA foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de água e 200  $\mu\text{L}$  de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v), o tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos tipo Vortex e centrifugado a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5415C) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubo novo onde foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), agitado e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, e a fase aquosa transferida para outro tubo. Para precipitação do cDNA foram adicionados 75  $\mu\text{L}$  (0,5 v) de acetato de amônio 4 M e 375  $\mu\text{L}$  (2,5 v) de etanol diluído a 95%. O tubo foi agitado vigorosamente e centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi removido e o DNA lavado com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 80% e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 10  $\mu\text{L}$  de água bidestilada estéril.

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

### **3.3.4. Ligação dos adaptadores ao cDNA**

Foram usados 5  $\mu\text{L}$  da reação de síntese da segunda fita de cDNA aos quais foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do adaptador *Marathon cDNA* (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  do tampão de ligação 5X e 1  $\mu\text{L}$  (400U) da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C

durante a noite. Após incubação a enzima foi inativada a 70°C por 5 minutos. O cDNA ligado ao adaptador foi diluído para 0,4 ng/μL em tampão tricina-EDTA (fornecido pelo *Marathon™ cDNA Amplification Kit*) estocados a -20°C.

### 3.3.5. Desenho dos iniciadores

Para amplificação do terminal 5' das seqüências dos clones 04, 07, 09, 10, *Bbriz*MMF (F09) e *Bbriz*SEC13 (H12) por 5'RACE foram desenhados iniciadores como apresentado na Tabela 1. Os iniciadores foram desenhados no sentido anti-senso utilizando o programa PRIMER 3, seguindo as informações fornecidas pelo *Marathon™ cDNA Amplification Kit*.

**Tabela 1:** Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação por 5'RACE dos clones 04, 09, 10, *Bbriz*MMF (F09) e *Bbriz*SEC13 (H12). AP1 e AP2: iniciadores do adaptador do *Marathon™ cDNA Amplification Kit* (Clontech).

Clone	Nome	Seqüência de nucleotídeos
04	RACE4_1	5' TCAGTTGCAGTCGCCTCTATACCA 3'
	RACE4_2	5' TCGGCAACTTGAACGCTACAGTCC 3'
	RACE4_3	5' CCCAGGTTAGTGGAAGTGTGTCCT 3'
	RACE4_4	5' CCTTGTGAACACGAGAAGCCTCTGA 3'
07	RACE7_1	5' CAGCAGACTACTCTCTCCTAAGGGAACA 3'
	RACE7_2	5' CCCTCGGCATCCTTTCTTCTTCTCT 3'
	RACE7_3	5' GCAAGTAGCGTCACATTCTCTTCCATC 3'
	RACE7_4	5' AGTTCTCAGCGACTCAAAGTCCTGCT 3'
	RACE7_5	5' CTCCAGCACCATATCTTCAACCCTCT 3'
09	CL 09 (70)	5' GTCGAGCTTCCTCTGGACATGGTT 3'
	CL 09 (239)	5' CCTTCTTCCTCTGGAGCTTCTTCA 3'
10	RACE10_1	5' CAGGCAAGTTTGACAAGGGCCAATAC 3'
	RACE10_2	5' GGCTCAAGATCCCTCAAGGTGCAT 3'
<i>Bbriz</i> SEC13	RACEH12_1	5' TCAACCTTCATCACCTCCTCCCAT 3'
	RACEH12_2	5' CTTTCCCCTTGGTCCAGATGACAAC 3'
<i>Bbriz</i> MMF	RACEF09_1	5' CGGACTTCATCTCTTGTGACCCACT 3'
	RACEF09_2	5' CCTCGTATGGGTCTCATCAGTTTG 3'
	AP1	5' CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
	AP2	5' ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC 3'



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

As reações foram realizadas com *Marathon™ cDNA Amplification Kit*, seguindo as instruções do fabricante. O cDNA com os adaptadores foi diluído para a concentração de 0,1 ng/μL em tampão tricina/EDTA, desnaturado por 2 minutos a 95°C e colocado imediatamente no gelo por 2 minutos.

Foi feita uma solução com 5 μL do tampão *High Fidelity 10X*, 2 μL (2 mM) de MgSO<sub>4</sub> (50 mM) e 0,2 μL da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase *High Fidelity* (5 U/ μL) (Invitrogen™), 5 μL (0,5 ng) de cDNA de ovários de *B. brizantha* estágio IV, 1 μL do iniciador AP1 e 1 μL do iniciador gene específico e água para completar o volume para 50 μL.

O programa utilizado para o 5'RACE foi: 1 minuto a 94°C; 4 ciclos de 30 segundos a 94°C e 4 minutos a 72°C; 4 ciclos de 30 segundos a 94°C e 4 minutos a 70°C; 34 ciclos de 20 segundos a 94°C e 4 minutos a 68°C, em termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems).

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

As bandas amplificadas foram excisadas e eluídas do gel utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean up System* (Promega), e clonadas no vetor pGEM®-T *Easy* (Promega) conforme orientação do fabricante. Células de *Escherichia coli* XL1 Blue, após a transformação por eletroporação (item 3.5.1), foram plaqueadas em 20 mL de meio sólido LB com ampicilina. As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/L para mini-preparação de DNA plasmidial.

## **3.4. Amplificação das regiões promotoras pela técnica de *genome walking* (*Genome Walker™ Universal Kit*)**

### **3.4.1. Construção das Bibliotecas**

As bibliotecas foram construídas com DNA genômico de folhas das plantas de *B. brizantha* de reprodução sexual e de reprodução apomítica. Foram construídas quatro bibliotecas para cada amostra de DNA, usando as enzimas de restrição *Dra* I, *EcoR* V, *Pvu* II e *Stu* I para digestão.

As digestões foram realizadas com 2,5 µg de DNA, 10 U/µL de enzima de restrição, tampão de reação 10X e água deionizada para volume final de 100 µL. A reação foi incubada a 37 °C por duas horas. Após esse período a reação foi agitada lentamente e colocada novamente a 37 °C por 18 horas.

Para purificação do DNA, foram adicionados em cada reação 95 µL de fenol. Os tubos foram agitados lentamente, e após centrifugação de 1 minuto foi separada a fase aquosa da fase orgânica. A fase aquosa foi transferida para novo tubo onde foram adicionados 95 µL de clorofórmio. Após rápida centrifugação, a fase aquosa foi transferida para tubo novo onde, para precipitação do DNA, foram adicionados 2 volumes de etanol resfriado a 4 °C diluído a 95%, 1/10 do volume de NaOAc 3 M (pH 4.5) e 20 µg de glicogênio. Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 14.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5810R) por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o DNA lavado em 100 µL de etanol resfriado a 4 °C diluído a 80 %. Seguiu-se nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o DNA, após secar, foi diluído em 20 µL de TE (pH 7.5).

### **3.4.2. Ligação dos Adaptadores**

De cada uma das oito reações (contendo DNA das plantas apomíticas e sexuais digeridos com as quatro diferentes enzimas), foram transferidos 4 µL para outro tubo para ligação dos adaptadores. Nos tubos foram adicionados 1,9 µL do adaptador *GenomeWalker* (25 µM), 1,6 µL do tampão de ligação 10X, e 0,5 µL da enzima T4 DNA Ligase (6 U/µL). As reações foram incubadas a 16 °C por 16 horas. Após esse período as reações foram incubadas a 70 °C por cinco minutos para parar a reação. Em cada tubo foram adicionados 72 µL de TE (pH 7.5).

### **3.4.3. Desenho dos iniciadores**

Para amplificação das regiões promotoras dos clones 09, 10, 21, *Bbriz*MMF (F09) e *Bbriz*SEC13 (H12) foram desenhados iniciadores como apresentado na Tabela 2. Os iniciadores foram desenhados no sentido anti-senso utilizando o programa PRIMER 3, seguindo as informações fornecidas pelo *Genome Walker*<sup>TM</sup> *Universal Kit* (Tab. 2).

**Tabela 2:** Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação das regiões promotoras dos clones 09, 10, 21, *Bbriz*MMF (F09) e *Bbriz*SEC13 (H12). AP1 e AP2: iniciadores do adaptador do *Genome Walker*<sup>TM</sup> *Universal Kit* (Clontech).

Clone	Nome	Sequência de nucleotídeos
09	GW09_1	5'-CACGGACCCTCCTCACAGTCTTGTTGC-3'
	GW09_2	5'-ATACTTCCGCTTCTTCCTCCAGGCCTT-3'
	GW10_1	5'AGAGGTTGTCAGGACAATGTAGCCAAA 3'
10	GW10_2	5'CCCGATGGTCATCAACATACTCAAAC 3'
	GW10_3	5' TACATGGCTTATACATAGGCGCTGAGG 3'
	GW10_4	5' ACAACCACACAAAAGCACCTACACAAT 3'
21	GW21_1	5'-TTACTTAGATCTCTGCCTCATCTTTCG-3'
	GW21_2	5'-CGCTTCTTCTTCCACTTGGCCCTCATG-3'
<i>Bbriz</i> MMF	GWF09_1	5' ACATCTCTTGCATCAAGCTCTGCTTCT 3'
	GWF09_2	5' TCATCGAGGTAATTGTCGTTGAAGAGG 3'
<i>Bbriz</i> SEC13	GWH12_1	5' TAAGAGCACTCTCCAGCTTCCAGCTAC 3'
	GWH12_2	5' ACAACTGAGTCAAACCTCCAGAGACA 3'
	AP1	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
	AP2	5' ACTATAGGGCACGCGTGGT 3'

#### 3.4.4. Reações de *Genome Walking*

Para cada gene foram feitas oito reações de *Genome Walking*, segundo as condições descritas no *Genome Walker*<sup>TM</sup> *Universal Kit*. DNA das plantas apomíticas e das sexuais foram digeridos com as quatro enzimas de restrição: *Dra* I, *Eco* RV, *Pvu* II e *Stu* I.

As reações foram realizadas com 2 µL das bibliotecas, 1 µL de dNTPmix (10 mM), 1 µL do iniciador AP1 (10 mM) e 1 µL do iniciador gene específico (10 mM), 5 µL do tampão *High Fidelity* 10X, 2 µL de MgSO<sub>4</sub> (50 mM) e 0,5 µL da enzima Platinum® Taq DNA *Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e água para completar o volume para 50 µL.

O programa utilizado foi: 5 minutos a 94 °C; 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C e 3 minutos a 68 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68 °C e 3 minutos a 68 °C, seguido de uma extensão de 10 minutos a 68 °C em termociclador Veriti<sup>TM</sup> de 96 poços (Applied Biosystems).

Para aumentar a especificidade dos produtos da primeira reação, uma segunda reação foi realizada utilizando 1 µL da primeira reação, um iniciador mais próximo ao

final da região 5' e o iniciador AP2 do Kit (10 mM). A reação foi feita nos mesmos parâmetros da primeira reação e utilizando o mesmo programa.

Para evitar a clonagem de produtos falso positivos uma terceira reação foi feita utilizando 1 µL da segunda reação e os dois iniciadores usados na segunda reação e com apenas com o iniciador AP2.

Essas reações foram realizadas usando: 1 µL da segunda reação, 0,5 µL de dNTPmix (10 mM), 0,5 µL do iniciador AP2 (10 mM) e 0,5 µL do iniciador gene específico (10 mM), 2,5 µL do tampão pht 10X e 0,5 µL da enzima Taq DNA Polimerase pht (Phoneutria) e água para completar o volume para 25 µL.

O programa utilizado foi: 3 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C e 2 minutos a 72 °C, seguido de uma extensão de 5 minutos a 72 °C em termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems).

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

Apenas as bandas presentes nas reações realizadas com os dois iniciadores foram excisadas e eluídas do gel utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean up System* (Promega), e clonadas no vetor pGEM®-T *Easy* (Promega) conforme orientação do fabricante. O produto da transformação em células XL1 *Blue* de *E. coli* foi plaqueado em 20 mL de meio sólido LB com ampicilina. As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/L para mini-preparação de DNA plasmidial.

### **3.5. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação**

Células competentes foram preparadas segundo protocolo descrito por (Sambrook, 2001). Uma cultura de *E. coli XL 1 Blue* (*Clontech*®) foi plaqueada em LB semi-sólido e incubada em estufa a 37°C por 16 horas. A partir de uma colônia isolada, crescida em placa de Petri, foi feito um pré inóculo em tubo cônico de 15 mL tipo Falcon™, contendo 5 mL de meio LB. A cultura foi incubada por cerca de 16 horas sob agitação vigorosa, a 37°C.

Um volume correspondente a 1/100 do pré inóculo foi diluído em 1L de meio L (bactotripton 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 0,5%) e incubado sob agitação vigorosa, a 37°C até atingir A<sub>600</sub> de 0,6. Após atingir a A<sub>600</sub> desejada, a cultura foi

mantida no gelo por 30 minutos e centrifugada a 4.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5810R, por 15 minutos, a 4°C. As bactérias foram ressuspensas em 500 mL de água bidestilada estéril e centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de solução de glicerol 10% (v/v). Após centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C, as células foram ressuspensas em 2 mL de glicerol 10% estéril. O material foi dividido em alíquotas de 40 µL e estocado a -80°C.

### **3.5.1. Transformação de *E. coli* por eletroporação**

Células de *E. Coli* foram transformadas por eletroporação, conforme descrito por Sambrook, 2001. Foram adicionados 2 µL da reação de ligação ao estoque de 40 µL de células competentes de *E. coli XL 1 Blue* (Clontech®). A mistura foi colocada em cuveta de eletroporação BioRad de 0,2 cm de distância entre os eletrodos. As células foram eletroporadas em eletroporador BioRad sob as seguintes condições: 200 Ω de resistência, 25 µF de capacitância e voltagem de 25 kV. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio LB ao sistema de eletroporação e essa cultura foi incubada a 37°C por uma hora sob agitação de 180 rpm. O volume total de cultura, cerca de 100 µL, foi plaqueado em meio LB sólido, contendo 100 mg/L de ampicilina, 20 µg/mL de X-gal e 0,16 mM de IPTG.

As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/L para mini-preparação de DNA plasmidial.

### **3.5.2. Mini-preparação de DNA plasmidial**

DNA plasmidial foi preparado segundo protocolo de (Sambrook, 2001) com modificações. As culturas de bactérias transformadas com os clones (3 mL) em estudo foram centrifugadas a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C, por 1 minuto. O sedimento foi ressuspensado em 100 µL de solução I (Glicose 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM) com 2 µL de RNase A (10 mg/mL) e 200 µL da solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) foram adicionadas. As amostras foram misturadas por inversão e colocadas no gelo. Em seguida foram adicionados 150 µL da solução III (acetato de potássio 5 M, ácido acético glacial), agitada lentamente e incubada no gelo por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa transferida para tubo novo onde foram precipitadas com 2 volumes de etanol 100%,

mantidas por 2 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 2 minutos. O DNA plasmidial foi ressuspendido em 30 µL de água bidestilada estéril.

O DNA plasmidial foi digerido com a enzima *EcoRI* (Invitrogen™) para verificação do tamanho dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X ( 5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

### **3.6. Sequenciamento de DNA**

Os clones foram quantificados (400 ng) e enviados para sequenciamento na Plataforma Genômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Na reação de sequenciamento foram utilizados os iniciadores M13 forward e M13 reverso, ou SP6 e T7 na concentração de 3,2 pmoles cada e 2 µL de mix do Big Dye 3.1Kit (Applied Biosystems). O sequenciamento das amostras foi feito em sequenciador ABI 3700 (Applied Biosystems).

#### **3.6.1. Análise das seqüências**

A análise das seqüências geradas no seqüenciador ABI3700 foi feita no endereço eletrônico <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>, utilizando o programa Electropherogram quality analysis (Togawa et al., 2003). O programa PHRED (Ewing et al., 1998) foi utilizado para analisar a qualidade dos cromatogramas gerados no seqüenciador. O programa CROSSMATCH foi usado para remover a seqüência do vetor e dos adaptadores do Kit de 5' RACE. Para o agrupamento de seqüências semelhantes (clusterização), foi utilizado o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). Esse programa estabelece um *contig*, que é uma seqüência consenso, derivada da junção de duas ou mais seqüências relacionadas, por múltiplos alinhamentos.

Para análise de similaridade foi utilizado o programa BLASTN contra o banco nr (não redundante) de nucleotídeos do NCBI e BLASTX contra o banco não redundante de proteínas do NCBI ([www.ncbi.nlm.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST)) (Altschul et al., 1997). O banco de dados PLACE (The plant cis-acting regulatory DNA elements) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo et al., 1998) foi utilizado para busca de motivos regulatórios nas regiões promotoras das seqüências estudadas.

### 3.7. Clonagem das sequências nos vetores

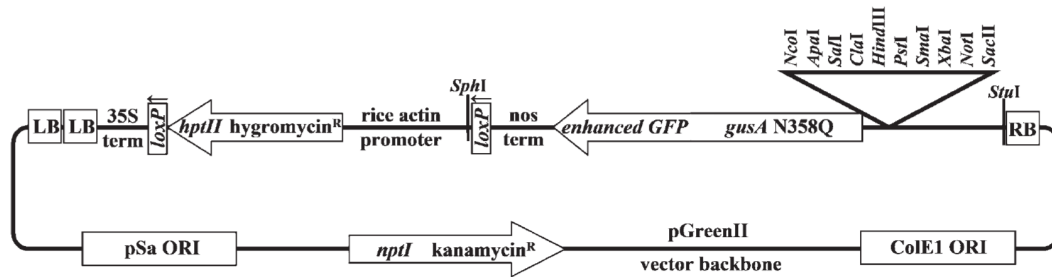
#### 3.7.1. pGpro2 (Genbank: EU147786) (Thilmony et al., 2006; Thilmony et al., 2009)

O vetor pGpro2 foi utilizado nas transformações de arroz cv. Primavera. As sequências amplificadas em experimentos de *genome walking* dos clones 09, 10 e 21 foram amplificadas usando iniciadores contendo na extremidade 5' sítios de restrição para as enzimas *Hind* III e *Xba* I (Tab. 3)

**Tabela 3:** Sequência dos iniciadores para os clones 09, 10 e 21 utilizados para amplificação das sequências para clonagem no vetor pGPro2 (Genbank: EU147786) (Thilmony et al., 2006; Thilmony et al., 2009).

Nome	Sequência de nucleotídeos
Pr9F_Xba2	5' taTCTAGACAGCTATGGAAAAATGACTCAG 3'
Pr9F1_Hind2	5' gtAAGCTTGGTGGCGGCGGTGGCTTG 3'
Pr9F2_Hind2	5' gtAAGCTTCTGCACAGACAAAACCAG 3'
Pr10F_Xba2	5' taTCTAGAGTGCTTGCACATGCTCTT 3'
Pr10R1_Hind2	5' gtAAGCTTCTGCAGATGTGTACAACAAA 3'
Pr10R2_Hind2	5' gtAAGCTTCTACAGAAGAGATCAACCGT 3'
Pr21F_Xba2	5' taTCTAGATAGGCACGTGTTATTGCTG 3'
Pr21R_Hind2	5' gtAAGCTTATATAGGTGGAGAGGGAAGC 3'

Os insertos foram clonados no vetor pGpro2, (Thilmony et al., 2006; Thilmony et al., 2009), vetor binário desenvolvido para transformação genética via *Agrobacterium*. Esse vetor possui um sítio para clonagem de promotores a serem estudados que vai dirigir a expressão dos genes repórteres *GUS* e e-GFP e o promotor de actina de arroz (Act 1) dirigindo a expressão do gene de resistência a higromicina (*hpt II*). As diferença entre os vetores pGpro1 (Fig. 3) e pGpro2 são duas mutações no promotor de actina de arroz (Act 1) que aumentam a expressão do gene *hptII*. O vetor foi digerido com as enzimas *Hind* III e *Xba* I para que ficasse com as mesmas bordas dos insertos.



**Figura 3:** Esquema do vetor binário pGPro1. LB: borda esquerda, 35S term: CaMV35S terminador da transcrição. loxP: sítio de recombinação Cre, hptII: *hygromycin phosphotransferase* II, nos term: terminador da transcrição da *nopaline synthase*, enhanced GFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*, gusA: β-glucuronidase, ORI: origem de replicação, RB: borda direita, nptI: *neomycin phosphotransferase* I (Thilmony et al., 2006).

A digestão do vetor e inserto foi feita nas seguintes condições: 10 µg do vetor ou inserto, 10 U da enzima *Hind* III (Invitrogen™), 10 U de *Xba* I (Invitrogen™), 1,0 µL do tampão *React* 2 10x e água para volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas.

### 3.7.2. pCAMBIA1391Z

O vetor pCAMBIA1391Z foi utilizado nas transformações de *Arabidopsis thaliana*. As sequências amplificadas em experimentos de *genome walking* dos clones 10 e 21 foram amplificadas usando iniciadores contendo na extremidade 5' sítios de restrição para as enzimas *Hind* III (Tab. 4).

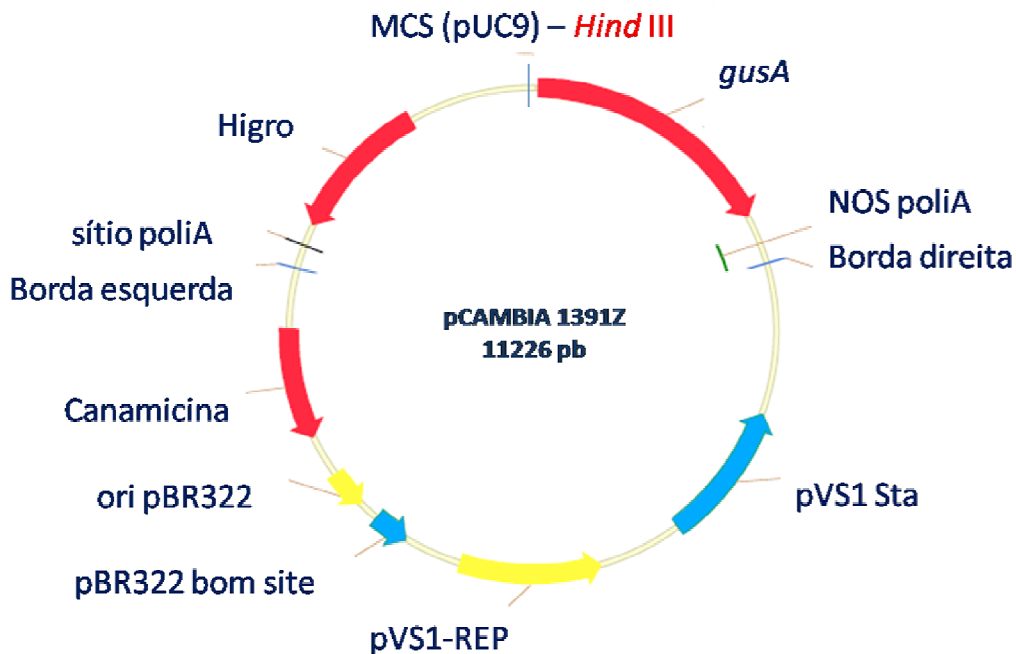
**Tabela 4:** Sequência dos iniciadores para os clones 10 e 21 utilizados para amplificação das sequências para clonagem no vetor pCAMBIA1391Z (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>).

Nome	Sequência de nucleotídeos
Pr10F_Hind	5' gtAAGCTTGTGCTTGCACATGCTCTT 3'
Pr10R1_Hind2	5' gtAAGCTTCTGCAGATGTGTACAACAAA 3'
Pr21F_Hind	5' gtAAGCTTTAGGCACGTGTATTTGTCTG 3'
Pr21R_Hind2	5' gtAAGCTTATATAGGTGGAGAGGGAAGC 3'

Os insertos foram clonados no pCAMBIA1391Z (Fig. 4), (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585>), vetor binário desenvolvido para transformação genética via *Agrobacterium*. Esse vetor possui um sítio para clonagem de promotores a serem estudados que vai dirigir a expressão dos genes repórteres *gusA*. O



promotor CaMV35s vai dirigir a expressão do gene de resistência a higromicina (*hpt II*). O vetor foi digerido com a enzima *Hind III* para que ficasse com as mesmas bordas dos insertos.



**Figura 4:** Esquema do vetor binário pCAMBIA1391Z. MCS: múltiplo sítio de clonagem Higo: *hygromycin phosphotransferase II* (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585> - modificado).

### 3.7.3. Ligação dos insertos nos vetores pGpro2 e pCAMBIA1391Z

Para ligação dos insertos no vetor foi utilizada a razão 3:1 (0,03 pmol de inserto: 0,01 pmol de vetor) no sistema de reação. Antes da ligação o vetor foi defosforilado para aumentar a eficiência da ligação nas seguintes condições: 500 ng do vetor, 0,5 µL da enzima *Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Fermentas), 2,0 µL do tampão da enzima 10 X e água para completar o volume de 20 µL.

Para o vetor pGPro2, a reação de ligação foi feita nas seguintes condições: 28,5 ng de vetor, 11,6 ng (clone 09) e 15,8 ng (clone 21) do inserto, 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen<sup>TM</sup>), 2,0 µL do tampão 5X da enzima e água para completar volume para 10,0 µL. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

Para o vetor pCAMBIA1391Z, a reação de ligação foi feita nas seguintes condições: 36,5 ng de vetor, 16,81 ng (clone 10) e 17,3 ng (clone 21) do inserto, 1 U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen™), 2,0 µL do tampão 5X da enzima e água para completar volume para 10,0 µL. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

Para transformação por eletroporação (item 3.5.1) foram utilizados 2,0 µL da ligação e extração do DNA plasmidial conforme item 3.5.2. Foi feito o sequenciamento do vetor utilizando os iniciadores M13F e M13 R para confirmar a ligação.

### 3.8. RT-qPCR (PCR quantitativo)

#### 3.8.1. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (versão 0.4.0) nos seguintes parâmetros: tamanho do amplicom entre 100 e 200 pb, temperatura de anelamento (Tm) entre 59–60°C, e tamanho dos iniciadores entre 19–21 pb.

O iniciador para o gene de referência para *B.brizantha*, foi da enzima de conjugação a ubiquitina, *BbrizUBCE2*, previamente caracterizado por Silveira (2009), o iniciador para o gene referência de arroz, UBQ5, foi desenhado conforme Jain (2006). As sequências dos iniciadores são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5:** Sequência dos iniciadores utilizados para reações de RT-qPCR para os Clones 04, 09,10, 21, *BbrizUBCE* (Silveira et al., 2009) e UBQ5 (Jain et al., 2006).

Sequência de nucleotídeos	
qRT04_F	5'TGATGATGCCAGTTCAAAGC 3' / qRT04_R 5'TATTTGCCCTCCTTGCTCTC 3'
qRT09_F2	5'CCTGCTGCTAAGAAGGATGC 3' / qRT09_R2 5'CACTGCCAAATTGCTCTTCA 3'
qRT10_F	5'CAAGTTCCTCATCGTCATGC 3' / qRT10_R 5'GGGCTGATCACTCCACACTT 3'
qRT21_F	5'AAGAAGAAGCGCATGAGGAG 3' / qRT21_R 5'GCATACAAAGCTTGCCATCA 3'
<i>BbrizUBCE</i>	5'ACCAGCACAAATCAAAGGA 3' / 5'GCCAAAGTATGAGACGACAGC 3'
R-UBQ5_F	5'ACCACTTCGACCGCCACTACT 3' / R-UBQ5_R 5'ACGCCTAAGCCTGCTGGTT 3'

#### 3.8.2. Preparo do cDNA e Reação de RT-qPCR

Os RNAs foram extraídos conforme itens 3.2.2 e 3.2.3 e tratados com a enzima DNase I (Invitrogen™), usando 0,5 U de enzima para cada 1 µg de RNA. O RNA foi incubado com a DNase a 37°C por 10 minutos, seguido de purificação com

fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o RNA foi precipitado com 1V de isopropanol a 4°C por 16 horas. Após centrifugação a 12.000 rpm de 20 minutos o precipitado foi lavado com etanol 70%, depois de seco foi ressuspendido em 20 µL de água tratada com DEPC 0,1%.

As reações de transcrição reversa foram feitas utilizando 2 µg de RNA total de ovários, anteras, folhas e raízes de plantas apomíticas e sexuais. Para ovários e anteras foi preparada uma mistura com 500 ng de RNA de cada estágio de desenvolvimento (I, II, III e IV). As reações foram feitas utilizando a enzima Superscript II (Invitrogen™) conforme protocolo do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram feitas em volume final de 20 µL, utilizando 5 µL da diluição do cDNA fita simples 1:100. As reações foram feitas com 10 µL do Kit Syber Green Rox Plus (LGCBio™) e 0,2 M de cada iniciador.

O programa utilizado foi: 15 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C (cDNA de *Brachiaria*) e 56°C (cDNA de arroz) e 20 segundos a 72°C. A curva de dissociação foi feita de 60°C a 95°C por 20 minutos em aparelho Mastercycler ep realplex (Eppendorf™). Os dados obtidos pela leitura da fluorescência foram exportados para planilha MS Excel (Microsoft) e analisados no programa Q-Gene software.

A eficiência da reação foi analisada usando uma mistura de todos os cDNAs (0,5 µg de cada um dos oito cDNAs) nas diluições de 1:10, 1:20 e 1:40. As reações foram feitas em triplicatas para cada iniciador dos genes específicos e para o gene de referência.

### **3.9. Hibridização in situ**

#### **3.9.1. Preparação dos ovários**

Os racemos foram coletados de plantas de *B.brizantha* do campo com auxílio de tesoura de poda, colocados em frascos de água e levados ao laboratório. Pistilos em diferentes estádios de desenvolvimento (Araújo et al., 2000) foram excisados sob microscópio estereoscópio Zeiss-Stemi SV11 e imersos em solução fixadora contendo, 4% de paraformaldeído, 0,25% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,01 M pH 7.2. Os ovários foram colocados sob vácuo por 1 hora, período após o qual a solução fixadora foi trocada e os ovários foram colocados na geladeira por 16 horas.

Após 16 horas os ovários foram lavados duas vezes em tampão fosfato 0,01 M e desidratados por incubação em série crescente de etanol, 10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 96%, por pelo menos uma hora em cada solução. Após a desidratação os ovários foram embebidos em série crescente de etanol e resina plástica butil-metilmetacrilato (BMM) (5:1, 5:2, 5:3, 5:4, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5; v/v) por pelo menos 4 horas e BMM puro (2 X por pelo menos 4 horas). Cada ovário foi colocado em cápsulas plásticas contendo BMM que foi polimerizado a 4 °C, em luz ultravioleta por 48 horas. Os ovários foram estocados a -20 °C.

### **3.9.2. Secção dos ovários**

Secções de 3,5 µm foram obtidas utilizando ultramicrótomo Leica Ultracut-UCT, com navalha de vidro, e colocadas sobre lâminas *ProbeOn™ Plus Microscope Slides Charged and Prcleaned* (FisherBiotech ®). As secções foram colocadas em gotas de água tratada com DEPC 0,1%, esticadas com vapor de clorofórmio e colocadas em placa aquecedora a 60°C por 24 horas.

### **3.9.3. Remoção do BMM**

As lâminas contendo as secções foram colocadas em cubas de vidro e tratadas com: acetona 100% por 12 minutos, nova acetona 100% por 8 minutos, solução de acetona: água (1:1) por 5 minutos e duas lavagens com água tratada com DEPC 0,1% por 5 minutos.

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

Para verificar a preservação do RNA algumas secções foram coradas com laranja de acridina. Em cada lâmina foram colocados 100 µL de tampão HCl-acetato pH 2.1 por 5 minutos, seguido de 0.05% de laranja de acridina em tampão HCl-acetato 0,2 M pH 2., sob lamínula, por 30 minutos em câmara úmida. As secções foram lavadas em tampão veronal-acetato pH 7.8 por 15 minutos e examinadas em luz ultravioleta emitida na faixa de 395 nm ou 510 nm, e foto documentadas em microscópio de epifluorescência Zeiss-Axiophot.

### 3.9.5. Preparo da sonda marcada com digoxigenina

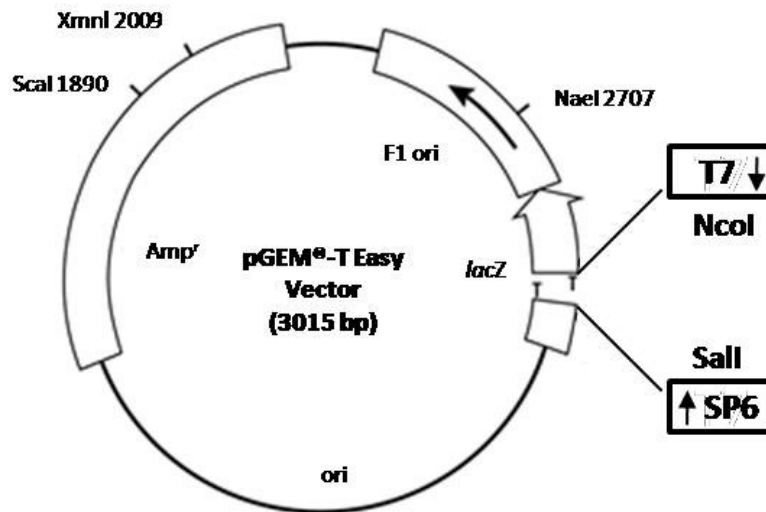
Para preparo das sondas de mRNA foram usados como moldes fragmentos de cDNA identificados como de expressão preferencial em órgãos reprodutivos de *B. brizantha*. Os fragmentos foram obtidos por PCR com iniciadores específicos para cada sequência (Tab. 6).

**Tabela 6:** Seqüência dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos utilizados para síntese da sonda para hibridização in situ. Clones 04, 09, 21, *Bbriz*MMF (F09) e *Bbriz*SEC13 (H12) e tamanho do fragmento gerado relativo a sonda utilizada nas hibridizações.

Seqüência de nucleotídeos	Sonda
RT04F 5' AAGGGCCAGGCTGTAGAAAT 3' / RT04R 5' AACAACTGGGTCTGGATG 3'	302 pb
RT09F 5' CGGCTGAGGAAACAAAGAAG 3' / RT09R 5' TGCAGCACAATAAAGGCAGA 3'	446 pb
RT21F 5' AAGAAGAAGCGCATGAGGAG 3' / RT21R 5' AGCAGCAAACAAAGCTCCAT 3'	298 pb
HibF09_F 5' CAGAGAGTGGGTCACAAGAG 3' / HibF09_R 5' GGCAACTTCCTCCATAACTT 3'	253 pb
HibH12_F 5' TACTGTCCATAGCTGCTGGT 3' / HibH12_R 5' ACTACGCATGTTACCAATC 3'	281 pb

Os produtos da PCR foram clonados no vetor *pGEM<sup>®</sup> -T Easy Vector Systems* (Invitrogen<sup>™</sup>) (Fig. 5) e mantidos em bactéria *XL1 Blue* de *E. coli*. O DNA plasmidial foi extraído com descrito no item 3.5.2. Os plasmídeos contendo os fragmentos foram linearizados com as enzimas de restrição *Sal I* e *Nco I* (Invitrogen<sup>™</sup>). Após linearização os plasmídeos foram purificados em fenol: clorofórmio (1:1; v/v) seguido de lavagem em clorofórmio puro. O DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M, pH 5,5:álcool etílico 100% (1:10; v/v), a -20°C por 2h30min. O sedimento foi lavado com álcool etílico 70%, e depois de seco, ressuspensionado em 25 µL de água DEPC e estocado à -20°C.

As sondas de mRNA, senso e anti-senso, foram sintetizadas por transcrição in vitro, a partir dos fragmentos de cDNA clonados no vetor *pGEM<sup>®</sup> -T Easy*, utilizando o *DIG RNA Labeling Kit* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade da sonda foi checada e quantificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,5 µg/ mL de brometo de etídio.



**Figura 5:** Esquema do vetor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems* (Invitrogen<sup>™</sup>) utilizado para clonagem das sequências para preparo das sonda de hibridização in situ, contendo os sítios de iniciação da RNA polimerase T7 e SP6 e sítios de enzimas utilizados para linearização do plasmídeos.

### 3.9.6. Reação de hibridização

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

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

Após a hibridização as secções foram lavadas em soluções de SSC 4X, SSC 2X, SSC, 1X E SSC 0,5X (SSC 20X = 3M NaCl; 0,3M Na<sub>3</sub>-citrato, pH 7,0) a 42°C por 30 minutos cada. Em seguida foram lavadas no tampão de detecção I (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M) por 5 minutos, incubadas em tampão de bloqueamento (Blocking Solution Roche<sup>®</sup>) por 30 minutos e nova lavagem no tampão de detecção I por 5 minutos. As secções foram incubadas com *Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments* (Roche) diluído 1: 1000 em tampão de detecção I por 2 horas. As secções, após serem lavadas duas vezes em tampão de detecção I, foram lavadas por 5 minutos em tampão de detecção III (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M; pH 9,5) e incubadas

na 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 de detecção III no escuro até ser observada a coloração nas secções. A reação de coloração foi interrompida por incubação em tampão de detecção IV (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; EDTA 1 mM) por 10 minutos. As secções foram lavadas em água duas vezes por cinco minutos cada. As lâminas foram montadas em glicerol 50% e fotodocumentadas em microscópio de Luz Zeiss-Axiophot.

### **3.10. Transformação de plantas modelo – Arroz e *Arabidopsis thaliana***

#### **3.10.1. Transformação de Arroz cv. Primavera**

##### **3.10.1.1. Meios de cultura com diferentes concentrações de higromicina para seleção de unidades embriogênicas**

Foram preparadas placas de Petri (100 x 20 mm) com meio de cultura MSI (Meio de Seleção I) (Tab. 7) (adaptado do meio R2S, Sallaud et al., 2003) com cinco concentrações diferentes de higromicina: 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L. Como controle experimental foram utilizadas placas contendo somente meio de cultura MSI, sem adição de higromicina e placas contendo o mesmo meio adicionado dos antibióticos timetina (100 mg/L) e cefotaxima (400 mg/L).

**Tabela 7:** Meios de cultura utilizados para indução e seleção das unidades embriogênicas (UE) de arroz cv. Primavera.

Reagentes	Indução NB básico <sup>5</sup>	MSI <sup>6</sup>
<b>Macronutrientes</b>	N6 <sup>4</sup>	R2 <sup>3</sup>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	N6 <sup>4</sup>	N6 <sup>4</sup>
<b>Micronutrientes</b>	B5 <sup>2</sup>	R2 <sup>3</sup>
<b>FeEDTA</b>	MS <sup>1</sup>	R2 <sup>3</sup> =MS <sup>1</sup>
<b>Vitaminas</b>	B5 <sup>2</sup>	R2 <sup>3</sup>
<b>Mio -inositol</b>	100 mg/L	-----
<b>Prolina</b>	500 mg/L	-----
<b>Glutamina</b>	500 mg/L	-----
<b>Caseína hidrolisada</b>	300 mg/L	-----
<b>2,4-D</b>	2,5 mg/L	2,5 mg/L
<b>Cefotaxima</b>	-----	400 mg/L
<b>Timetina</b>	-----	100 mg/L
<b>Higromicina</b>	-----	5 a 100 mg/L
<b>Sacarose</b>	3 %	3 %
<b>Phytigel</b>	0,36 %	-----
<b>Agarose tipo I</b>	-----	7 g/L

MS<sup>1</sup> (Murashige et al., 1962), B5<sup>2</sup> micronutrientes e vitaminas (Gamborg et al., 1968), R2<sup>3</sup> Macro e micronutrientes, vitaminas e FeEDTA (Ohira K., 1973), N6<sup>4</sup> Macro e micronutrientes (Chu, 1978), Meio Indução NB<sup>5</sup> básico e MSI<sup>6</sup> (adaptado do R2S) (Sallaud et al., 2003).

### 3.10.1.2. Cultura de Tecidos

As sementes maduras de arroz, depois de descascadas, foram desinfetadas em etanol 70% por 5 minutos, hipoclorito de sódio 5%, contendo 3 gotas de detergente Tween<sup>R</sup> 20, por 30 minutos e lavadas seis vezes em água destilada esterilizada.

Sementes desinfetadas foram plaqueadas em meio de indução NB básico (Tab. 7), em placas de Petri (100 x 20 mm), a 10 sementes por placa e incubadas no escuro a 28°C por 30 dias. Após esse período, as unidades embriogênicas (UE) de 0,5-1 mm foram separadas e transferidas para novo meio de indução NB básico em placas de 100 x 15mm. Em cada placa foram colocadas 70 unidades embriogênicas. Os explantes foram incubados por 10 dias no escuro. Após este período as unidades embriogênicas



com tamanho em torno de 3-5 mm foram transferidas para Meio de Seleção I (MSI) (Tab. 7), 10 unidades por placa.

Foram usados 30 explantes em cada tratamento, exceto nas placas controles (sem higromicina) e na concentração de 100 mg/L de higromicina, nas quais foram usados 20 explantes.

O desenvolvimento das unidades embriogênicas foi observado 4, 9, 14 e 21 dias após a transferência dos explantes para o meio de seleção I (MSI) com as diferentes concentrações de higromicina.

O desenvolvimento dos explantes foi avaliado com as notas: + + + para UE com desenvolvimento normal; + + para UE com desenvolvimento comprometido e + para UE não desenvolvida e oxidada.

### **3.10.1.3. Análises estatísticas**

A fim de estimar a dose letal do antibiótico higromicina necessária para matar 100 % dos explantes, denotada por DL100 %, utilizou-se o modelo binomial de dose resposta com função de ligação logística (McCullagh, 1989). Para melhorar as estimativas do modelo foi necessário aplicar o logaritmo neperiano na variável explicativa (Dose). As análises foram desenvolvidas no programa de linguagem estatística R, versão 2.9.1. (2009), em que o nível de significância estatística adotado foi de 5%.

Para os cálculos de dose letal, foram considerados apenas os dados com 21 dias de cultura em meio de seleção.

### **3.10.1.4. Parâmetros de biobalística usados para transformação genética de unidades embriogênicas de arroz**

#### **3.10.1.4.1. Precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio**

Para a precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio a umidade relativa do ar foi verificada e o experimento realizado em condições de, no máximo, 50%.

Partículas de tungstênio M10 foram submetidas a ultrassom por 5 minutos e mantidas sob agitação em agitador tipo Vortex por 10 minutos. Em cada tubo de microcentrífuga do tipo Eppendorf foram adicionados nesta ordem: 50 µL (60 mg/mL) de partículas, 8 ou 10 µg (1 µg/µL) de DNA plasmidial, 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M e 20 µL

de espermidina 0,1 M, sempre sob agitação. Os tubos foram submetidos à agitação por dez minutos e centrifugados a 12.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C, por dez segundos. Retirou-se em seguida o sobrenadante e adicionou-se 150 µL de etanol absoluto para suspender as partículas. Esta etapa de lavagem foi repetida duas vezes. Por fim, as partículas foram ressuspensas em 24 µL de etanol absoluto, colocadas em sonificador Branson B1210E-MTH, para desaglomeração por 1 a 2 segundos, e em cada membrana carreadora foram aplicados 3,2 µL, espalhados uniformemente na área central das membranas. As membranas carreadoras foram deixadas no dessecador com sílica gel por pelo menos dez minutos antes do bombardeamento, para total evaporação do etanol.

#### **3.10.1.4.2. Condições de bombardeamento**

Os experimentos de biobalística foram realizados com: 10 µg de DNA plasmidial, pressão do gás hélio de 900 psi, distância entre o explante e a membrana carreadora de 6 cm e 25 lbs de vácuo.

#### **3.10.1.4.3. Análise histoquímica do gene *GUS***

Para verificação do nível de expressão do gene *GUS*, 24 após o bombardeamento, as unidades embriogênicas de arroz foram incubadas em uma solução de X-Gluc (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 100 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O 0,5 mM, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O 10 mM, Triton<sup>®</sup> X-100 0,1%, X-Gluc 50 mg/mL 1 mM) por 16 horas a 37°C (Jefferson et al., 1987). O resultado foi observado observando-se os tecidos em microscópio estereoscópio Zeiss-Stemi SV11.

#### **3.10.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens***

O vetor pCAMBIA1391Z com as sequências dos promotores clonadas foram usados para transformar a *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Foram adicionados 2 µL do vetor (100 ng) ao estoque de 50 µL de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. A mistura foi colocada em cuveta de eletroporação BioRad de 0,2 cm de distância entre os eletrodos. As células foram eletroporadas em eletroporador BioRad sob as seguintes condições: 200 Ω de resistência, 25 µF de capacitância e voltagem de 2,4 kV. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio LB ao sistema e essa cultura foi incubada a 26°C por duas

horas sob agitação vigorosa (180 rpm). O volume total de cultura, cerca de 100 µL foi plaqueado em meio LB sólido, contendo 100 mg/L de canamicina, 50 mg/L de rifampicina e 25 mg/L de gentamicina. As colônias positivas para as construções foram identificadas por PCR utilizando iniciadores específicos.

### **3.10.3. Transformação de *Arabidopsis thaliana***

As plantas de *Arabidopsis thaliana* foram transformadas pelo método *floral dip* de acordo com Clough et al. (1998).

As colônias de *Agrobacterium tumefaciens* contendo as construções pBbrizRPS15a:GUS e pBbrizRPL41:GUS foram colocadas separadamente em 3 mL de meio LB contendo 100 mg/L de canamicina, 50 mg/L de rifampicina e 25 mg/L de gentamicina, e incubadas a 26°C por 24 horas. Após esse período essa cultura foi inoculada em 250 mL de meio LB seletivo e incubada a 26°C até chegar a densidade ótica, OD600, entre 0,6 a 0,8. A cultura foi centrifugada a 4.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5810R, por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células foram ressuspendidas em 250 mL de solução de sacarose 5% (P/V), contendo Silwett L-77 0,05% (V/V). Essa solução foi utilizada para transformação de *Arabidopsis thaliana* col-0, pelo método *floral dip*, onde as flores em estágio antes da antese são mergulhadas na solução. Foram transformadas 6-8 plantas por construção. As plantas transformadas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 22°C ± 2°, em fotoperíodo de 12 horas até a produção de sementes.

#### **3.10.3.1. Análise das plantas transformadas**

As sementes das plantas de *A. thaliana* transformadas com os promotores de *BbrizRPS15a* (pBbrizRPS15a:GUS) e *BbrizRPL41* (pBbrizRPL41:GUS) foram selecionadas em placa de Petri (150x15mm) contendo meio MS1/2 (contendo a composição em sais reduzida a metade) com 50 mg/L do antibiótico higromicina. As plantas sobreviventes foram transferidas para vaso com terra e crescidas em sala de crescimento com temperatura de 22°C ± 2°, em fotoperíodo de 12 horas.

Seis plantas de pBbrizRPS15a:GUS e 10 plantas de pBbrizRPL41:GUS foram analisadas por PCR usando iniciadores para o gene *GUS* e iniciadores internos aos promotores juntamente com iniciador para *GUS*.

### **3.10.3.1.1. Extração de DNA de folha para PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Uma folha de aproximadamente 2 cm de cada planta foi retirada e macerada com bastão de vidro em 200 µL de tampão de extração (Tris-HCl pH 7.5 0,2 M; NaCl 0,25 M; EDTA 0,025 M e SDS 0,5%). O material foi misturado em agitador tipo Vortex e centrifugado duas vezes a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo novo onde adicionado 1 volume de isopropanol. O material foi misturado em agitador tipo Vortex e após centrifugação a 13.000 rpm, em centrífuga Eppendorf 5415C, por 10 minutos o sobrenadante foi retirado e o DNA foi lavado, 2 vezes, em 100 µL de etanol 75 %. Após secar, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de água.

Para a PCR foram usados 2 µL de DNA, tampão da Taq 1X, dNTPs 0,13 mM, iniciadores para o gene *GUS*, GUS251 F-TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT, GUS671 R-ATCACGCAGTTCAACGCTGAC 0,2 µM, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutra) e água bidestilada para volume final de 50 µL. O programa utilizado foi: 5 minutos a 95° C; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C, seguido de 5 minutos a 72°C; em termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems).

O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TBE 0,5X ( 5,4 g de Tris, 2,75 g de ácido bórico, e 2 mL de EDTA 500 mM pH 8,0).

### **3.10.3.2. Análise histoquímica do gene *GUS***

Flores foram incubadas em uma solução de X-Gluc por 16 horas a 37°C (Jefferson et al., 1987). Após incubação as amostras foram lavadas com tampão 1X PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e clareadas em solução de 20% ácido láctico / 20% glicerol em tampão 1X PBS.

As flores foram dissecadas e analisadas para a presença de GUS nas anteras e óvulos em microscópio de Luz Zeiss-Axiophot. Imagens foram obtidas com AxioCam (Zeiss) usando o programa Axiovision (versão 4.1).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Anotação funcional de sequências de cDNA de expressão em ovários

Visando identificar sequências de alta expressão em órgãos reprodutivos de *B. brizantha*, as sequências de cDNA dos clones 04, 07, 09, 10 e 21 isoladas por Differential Display-RT PCR - DDPCR de ovários das plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha* (Rodrigues et al., 2003), com forte sinal nos ovários, em megasporogênese e megagametogênese, foram comparadas em bancos de dados, NCBI.

Os resultados de comparação de sequências estão apresentados na Tabela 8. A sequência do clone 04 mostrou similaridade com sequências de proteínas hipotéticas de milho (83%) e arroz (75%), com uma proteína de ligação a calmodulina de *Arabidopsis* (65%) e com a glucosidase II subunidade beta (putativa) de mamona (57%). A sequência do clone 07 apresentou similaridade com proteínas hipotéticas de milho (92%) e mamona (70%), essas duas proteínas hipotéticas apresentam a região SMC\_prok\_A, da proteína de segregação de cromossomo SMC. Este clone apresentou também similaridade com uma proteína quinase cálcio dependente - CPK 1- putativa de *Vitis vinifera*, e de arroz, a qual também possui a região SMC\_prok\_A. Os clones 09, 10 e 21 apresentaram similaridade com proteínas ribossomais em bancos de dados. O clone 09 mostrou similaridade com a proteína ribossomal S8 de arroz, milho, sorgo e *Arabidopsis* (Lacerda, 2007). O clone 10 apresentou similaridade com sequências da proteína ribossomal S15a de milho, *Arabidopsis*, canola e arroz. A sequência do clone 21 apresentou similaridade com sequências de mRNA de milho e com sequência da proteína ribossomal L41, de arroz, tabaco e cevada (Lacerda, 2007). Neste trabalho os clones 09, 10 e 21 foram renomeados para *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*, respectivamente.

**Tabela 8:** Análise das seqüências dos clones 04, 07 e 10 utilizando o programa BLASTX contra o banco nr (não redundante) de seqüências de proteínas do NCBI (www.ncbi.nlm.gov/ BLAST) (Altschul et al., 1997).

Clone	GenBank ID	Seqüência	e-value	Similaridade
<b>04</b>	NP_001146236	<i>Zea mays</i> - Proteína hipotética LOC100279808	4e-156	83%
	EAY73501.1	<i>Oryza sativa</i> - Proteína hipotética OsI_01383	5e-139	75%
	NP_568840.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> - Proteína de ligação a calmodulina	8e-74	65%
	XP_002523398	<i>Ricinus communis</i> - glucosidase II subunidade beta, putativa.	8e-69	57%
<b>07</b>	NP_001131337.1	<i>Zea mays</i> - Proteína hipotética LOC100192653	4e-111	92%
	dbj BAD53576.1	<i>Oryza sativa</i> (Japonica Group) <i>calcium-dependent protein kinase CPK1 adapter protein 2-like</i>	1e-105	87%
	XP_002530745.1	<i>Ricinus communis</i> - Proteína hipotética conservada	2e-85	70%
	XP_002268827.1	<i>Vitis vinifera</i> - Similar a <i>putative calcium-dependent protein kinase CPK1 adapter protein 2</i>	3e-67	69%
<b>10</b>	NP_001146975.1	<i>Zea mays</i> - 40S proteína ribossomal S15a	2e-67	99%
	NP_172256.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> - proteína ribossomal s15a (RPS15aF)	3e-67	97%
	Q00332.3	<i>Brassica napus</i> - 40S proteína ribossomal S15a	8e-67	96%
	NP_001046846.1	<i>Oryza sativa</i> - 40S proteína ribossomal S15a	7e-66	96%

#### 4.2. Amplificação das seqüências codificadoras e regiões promotoras putativas pelas técnicas de 5'RACE e *Genome walking*

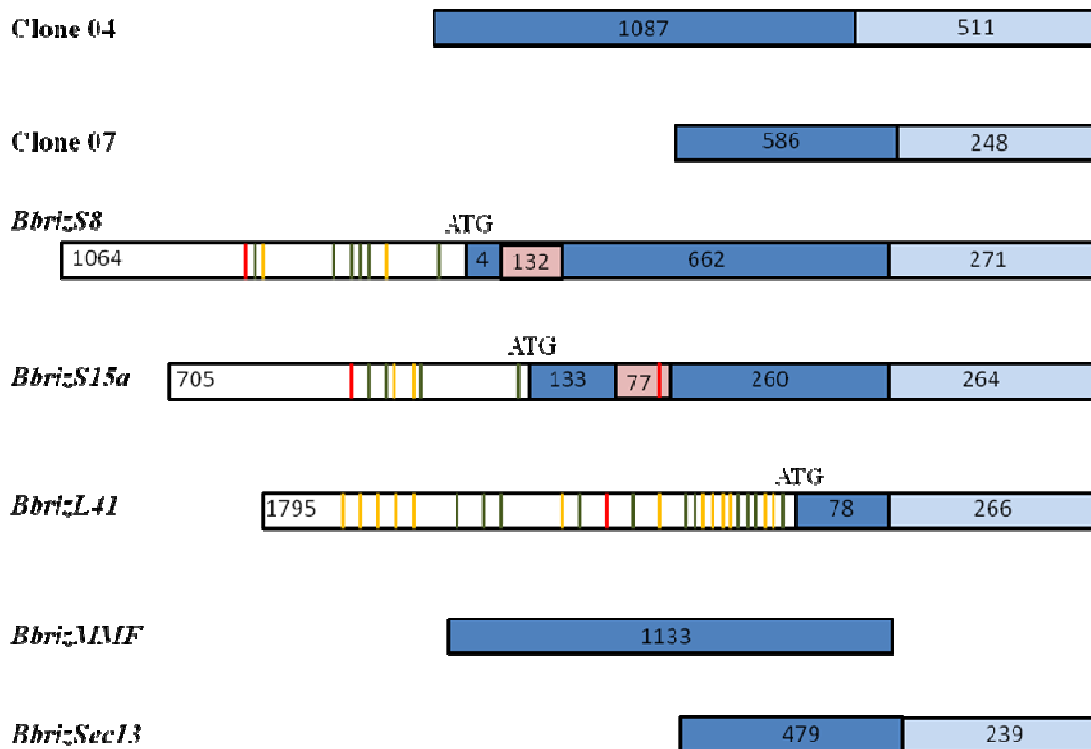
Para identificação da região promotora putativa das seqüências em estudo, estas foram amplificadas por 5'RACE e *Genome walking*.

A seqüência do clone 04 inicialmente com 485 pb foi estendida até 1.084 pb, utilizando seis iniciadores em reações de 5'RACE (Fig. 6, Tab. 9). A seqüência inicial do clone 07 de 256 pb, após as amplificações por 5'RACE atingiu 834 pb (Fig. 6, Tab. 9).

**Tabela 9:** Resultados das ampliações das sequências dos clones 04, 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a*, *BbrizRPL41*, *BbrizMMF* e *BbrizSec13* pelas técnicas de 5'RACE e *genome walking*.

Clone	cDNA		Região codificadora	Região 5'UTR
	inicial	final	predita	(Genome walking)
04	485 pb	1084 pb	1940 pb	.....
07	256 pb	834 pb	1000 pb	.....
<i>BbrizRPS8</i>	530 pb	666 pb	666 pb	1064 pb
<i>BbrizRPS15a</i>	220 pb	657 pb	657 pb	705 pb
<i>BbrizRPL41</i>	75 pb	75 pb	75 pb	1770 pb
<i>BbrizMMF</i>	737 pb	1133 pb	1277 pb	.....
<i>BbrizSec13</i>	530 pb	718 pb	1150 pb	.....

A sequência do clone *BbrizRPS8*, inicialmente com 530 pb, teve a sua extremidade 5' estendida, utilizando a técnica de 5'RACE, até o códon de iniciação ATG ficando com 666 pb. A técnica de *genome walking* foi utilizada para busca da região promotora putativa dessa sequência. A partir dessa técnica foi identificado um íntron se iniciando logo após o ATG (códon de iniciação) com 128 pb e foi amplificada uma região de 1.064 pb (Fig. 6, Tab. 9). Essa sequência de 1.064 pb e mais uma sequência que inclui o íntron de 1.200 pb (Fig. 6), foram amplificadas com iniciadores específicos contendo sítios de restrição das enzimas *Hind* III e *Xba* I para clonagem no vetor de expressão pGPro2 e pCAMBIA1391Z para transformação de arroz e *Arabidopsis*, respectivamente.



**Figura 6:** Esquema de extensão dos clones 04, 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a*, *BbrizRPL41*, *BbrizMMF* e *BbrizSec13* por 5'RACE e *Genome walking*. A cor azul clara representa o a região 3'UTR (não traduzida) a cor azul escura representa a região codificadora (ORF), a cor rosa representa íntrons e a cor branca representa a região promotora putativa. Dentro das regiões brancas, os traços coloridos representam motivos característicos de: verde - expressão específica em pólen (POLLEN1LELAT52), amarelo - expressão específica em raiz (ROOTMOTIFTAPOX1) e vermelho - relação com a resposta à auxina. O tamanho de cada região é indicado em número de nucleotídeos.

A sequência de *BbrizRPS15a* de 220 pb, foi amplificada até 657 pb por 5'RACE, dentro da qual foi identificada a região codificadora completa. Reações de *genome walking* conduzidas na busca da região promotora, levaram à amplificação de um íntron de 77 pb e de uma região 5' não traduzida de 705 pb (Fig. 6, Tab. 9). O íntron foi identificado devido à presença dos sítios de excisão de íntrons, as extremidades 5' e 3' dos íntrons são GU e AG, respectivamente. A sequência de 705 pb e uma sequência que incluiu esses 705 pb mais a região do íntron totalizando 915 pb, foram amplificadas com iniciadores específicos contendo sítio de restrição das enzimas *Hind* III e *Xba* I para futura clonagem no vetor pGpro2 e pCAMBIA1391Z.

A sequência de *BbrizRPL41* de similaridade com a sequência da proteína ribossomal L41, composta por apenas 25 aminoácidos já estava completa. Utilizando a



técnica de *genome walking* foi possível aumentar a região 5' em 1.770 pb (Fig. 6, Tab. 9). Essa região foi amplificada com iniciadores específicos contendo sítios das enzimas de restrição *Hind* III e *Xba* I para clonagem do vetor de expressão pGPro2 (Genbank: EU147786) (Thilmony et al., 2006; Thilmony et al., 2009) e pCAMBIA1391Z.

Nas regiões promotoras de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* foram encontrados motivos relacionados à resposta à auxina, expressão específica em pólen (POLLEN1LELAT52) e motivos de expressão específica em raiz (ROOTMOTIFTAPOX1). O sítio de ligação ASF1, envolvido na ativação transcricional de vários genes por auxina, está presente na região promotora *BbrizRPS8* e na sequência do íntron de *BbrizRPS15a*. O elemento de resposta a auxina, AuxRE, e o sítio de ligação para fatores de resposta a auxina, ARF, está presente na região promotora de *BbrizRPS15a* e na região promotora de *BbrizRPL41*.

A sequência de *BbrizMMF* possuía inicialmente 737 pb, após extensão por 5'RACE a sequência ficou com 1.133 pb, mas ainda não possui a região codificadora completa faltando cerca de 144 pb (Fig. 6).

Já a sequência de *BbrizSec13* inicialmente com 530 pb foi amplificada para 718 pb, faltando para completar a região codificadora cerca de 432 pb (Fig. 6). Para as duas sequências, embora tenha sido utilizado um segundo par de iniciadores para 5' RACE e iniciadores para *genome walking*, só houve amplificação de produtos inespecíficos.

#### **4.3. Análises quantitativas da expressão dos clones 04, 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* por RT-qPCR**

Por ser uma técnica mais sensível na detecção da expressão relativa de genes, o RT-qPCR foi escolhido para avaliar a diferença na expressão das sequências estudadas entre órgãos reprodutivos, ovários e anteras, e órgãos vegetativos, folhas e raízes.

As análises de RT-qPCR, utilizando iniciadores desenhados nas sequências de *B. brizantha*, foram realizadas com cDNA de *B. brizantha* para: clone 04, clone 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*.

Para avaliar a presença dos transcritos em arroz, visando futura transformação genética desta planta, RT-qPCR, foi realizado com cDNA de arroz cv. Primavera para o clone 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*.

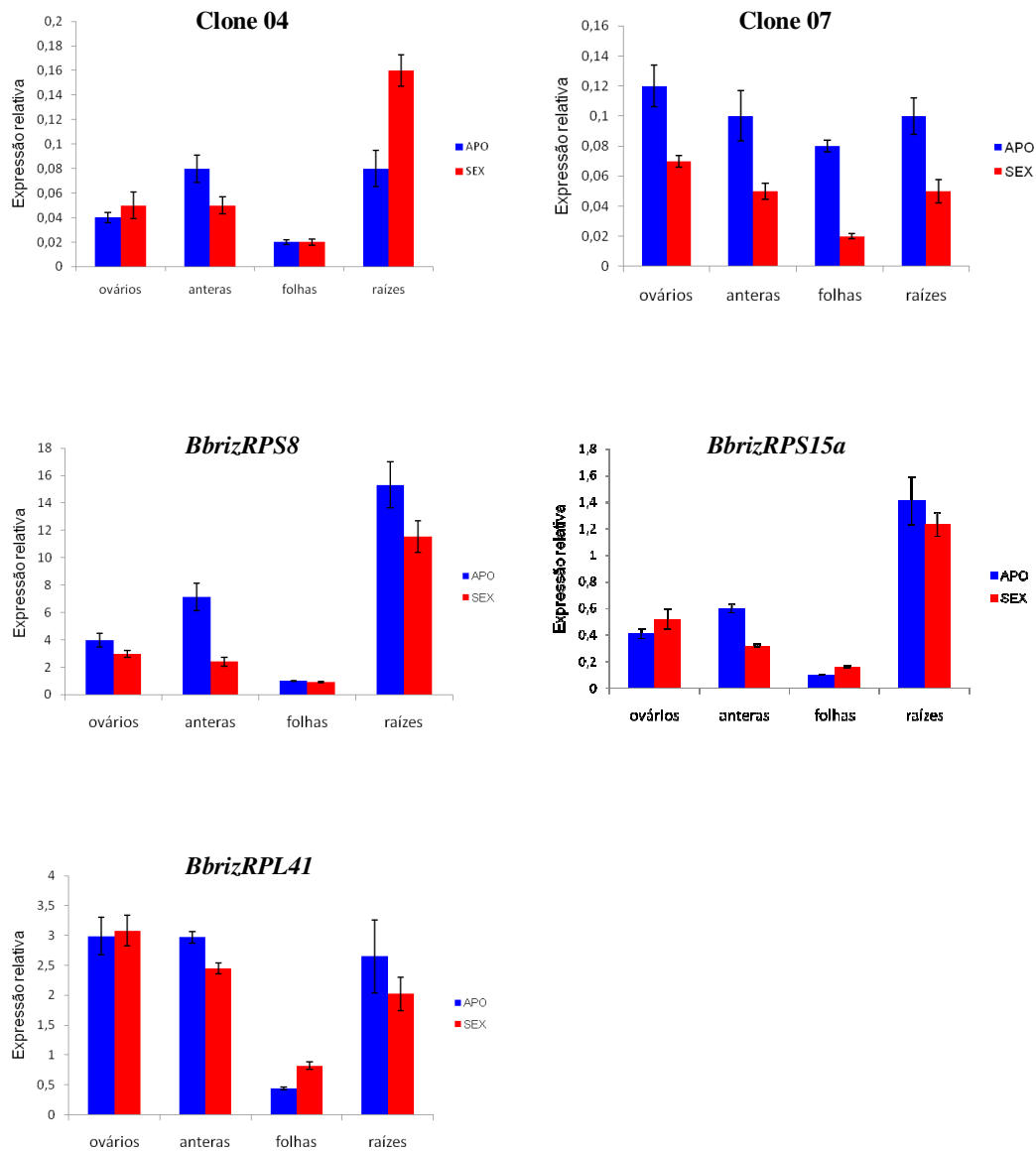
As reações foram realizadas com pool de RNA de ovários e anteras (contendo os quatro estádios de desenvolvimento) porque o objetivo foi analisar se a expressão era

maior nesses órgãos do que em folhas e raízes, e não de observar a diferença de expressão durante o desenvolvimento.

#### **4.3.1. RT-qPCR - *B. brizantha***

Nas análises dos resultados de PCR em tempo real o clone 04 apresentou expressão similar em ovários das plantas apomíticas e sexuais. Em anteras a expressão foi 1,6 vezes maior na planta apomítica. A menor expressão observada foi em folha independentemente do modo de reprodução, em raízes a expressão foi duas vezes maior na planta apomítica do que na planta sexual (Fig. 7).

Para o clone 07 a maior expressão foi observada nos ovários nos dois tipos de reprodução. Em relação à expressão nas folhas, na planta apomítica, a expressão foi apenas 1,5 vezes menor do que em ovário, enquanto que na sexual essa diferença foi de 3,5 vezes. A diferença de expressão em anteras e raízes foi equivalente nos dois tipos de reprodução (duas vezes maior em apomíticas do que em sexual). No geral, o clone 07 apresentou maior expressão na planta apomítica quando comparada à sexual para todos os órgãos analisados (Fig. 7).



**Figura 7:** RT-qPCR dos clones 04, 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* mostrando sua expressão em ovários, anteras, folhas e raízes de *B. brizantha* apomítica e sexual. Nas abscissas, amostras de cDNA sintetizado a partir de RNA total de ovários em pré antese; anteras em pré antese; folha jovem; raiz. Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas. Eixo das ordenadas: expressão relativa ao gene de referência *BbrizUBCE* (Silveira et al., 2009).

Para o clone *BbrizRPS8* foi observada maior expressão nas raízes do que nos órgãos reprodutivos (ovários e anteras) e folhas nos dois tipos de reprodução. Na planta apomítica a expressão em ovários e anteras foi 6,6 vezes maior do que em folhas e na planta sexual essas razões foram de 3,7 vezes maior em ovários e 2,9 vezes maior em anteras do que em folhas. Em relação à expressão nos ovários, a expressão foi similar

entre os dois tipos de reprodução (Fig. 7). No geral, foi observada maior expressão nas plantas apomíticas do que nas sexuais.

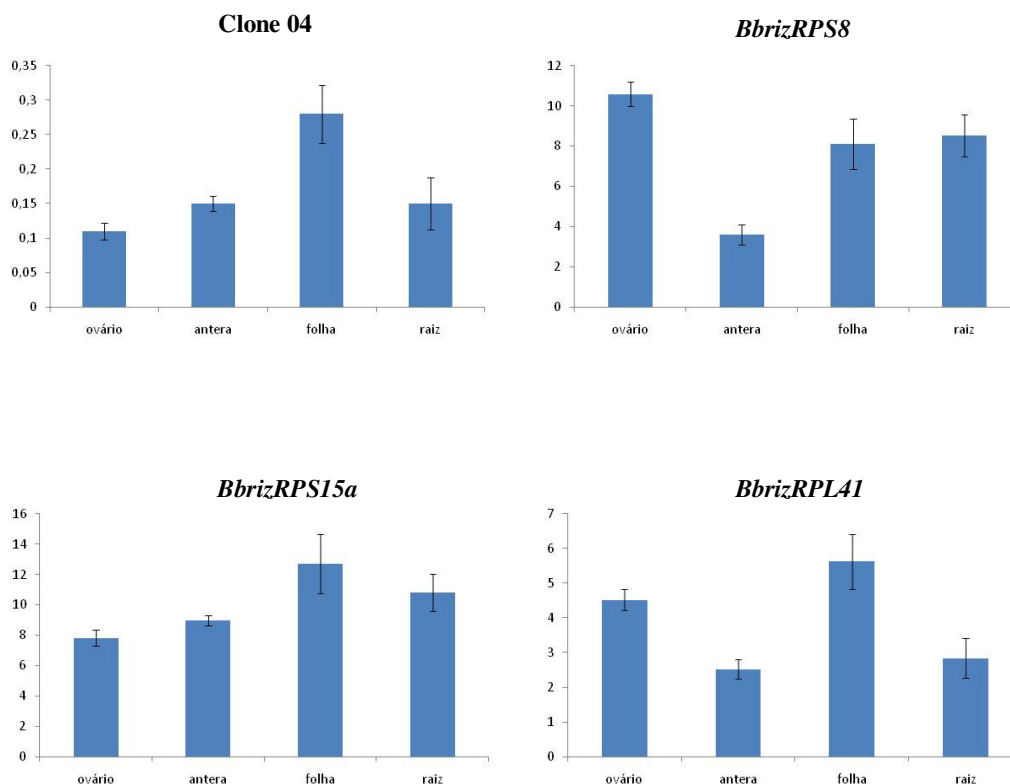
*BbrizRPS15a* apresentou maior expressão em raízes, ovários e anteras quando comparado às folhas. Nas plantas apomíticas a expressão desse gene em ovários e anteras é 3,9 e 7,1 vezes maior do que em folhas. Na plantas sexuais, em ovários a expressão é 3,2 vezes e em anteras 2,5 vezes maior do que nas folhas. A maior expressão encontrada foi nas raízes (Fig. 7).

As análises mostraram expressão similar de *BbrizRPL41* em ovários, anteras e raízes, e expressão mais baixa em folhas tanto nas plantas apomíticas como nas sexuais. Nas plantas apomíticas foi observado em ovários expressão 4,1 vezes maior do que em folha. Nas plantas sexuais a expressão desse gene em ovários foi de 6 vezes maior do que em folhas (Fig. 7).

#### **4.3.2. RT-qPCR - Arroz cv. Primavera**

Iniciadores do clones 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* desenhados em sequências de *B.brizantha* mostraram a presença do transcrito em arroz quando usados em cDNA de ovários, anteras, folhas e raízes de arroz.

O clone 04, apresentou maior expressão em folhas, sendo a expressão 2,5 vezes maior do que em ovários. Para *BbrizRPS8*, foi observada expressão um pouco mais alta em ovários quando comparada a outros tecidos. *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* apresentaram expressão um pouco mais alta em folha do que nos outros tecidos (Fig. 8).



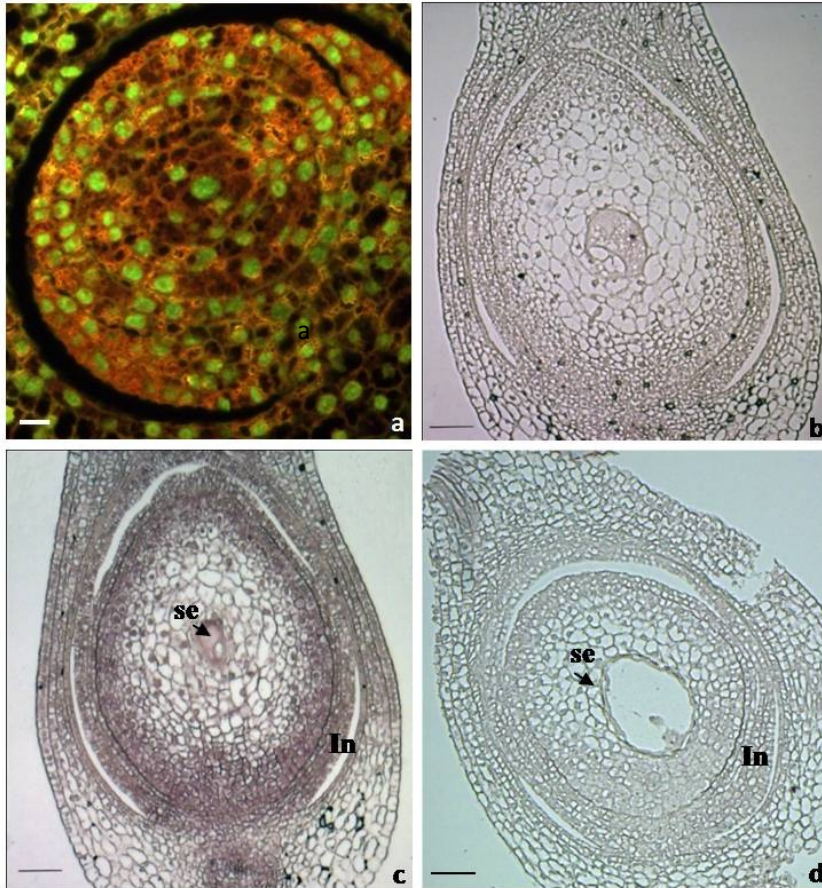
**Figura 8:** Expressão relativa dos clones 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* em ovários, anteras, folhas e raízes de arroz cv. Primavera por RT-qPCR. Nas abscissas, amostras de cDNA sintetizado a partir de RNA total de ovários em pré-antese; anteras em pré-antese; folhas jovens e raízes. Barra: Erro-padrão da média de um experimento contendo triplicatas técnicas. Eixo das ordenadas: expressão relativa ao gene de referência UBQ5 (Jain et al., 2006).

#### 4.4. Localização da expressão dos clones 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPL41*, *BbrizMMF* e *BbrizSec13* em células e tecidos de ovários e/ou anteras durante o desenvolvimento de *B. brizantha* apomítica e sexual

A localização espacial dos transcritos referentes aos clones 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPL41*, *BbrizMMF* e *BbrizSec13* em ovários ou anteras de *B. brizantha* apomítica e sexual foi feita por hibridizações in situ. Esses clones foram escolhidos por terem apresentado maior expressão em ovários e anteras por RT-qPCR e pelo interesse de caracterizar a expressão desses genes em tecidos reprodutivos de *B. brizantha*.

Nas secções dos ovários após coloração com laranja de acridina foi observada a coloração laranja que indica a preservação do RNA nas amostras (Figura 9a). Nas hibridizações com o clone 04 com a sonda senso (controle negativo) não foi observado

sinal de hibridização (Fig. 9b). Sinal de hibridização generalizada foi observado em ovários de plantas sexuais em megagametogênese, com sinal mais forte no saco embrionário e tegumentos (Fig. 9c). Em ovários de plantas apomíticas não foi observado sinal de hibridização (Fig. 9d).

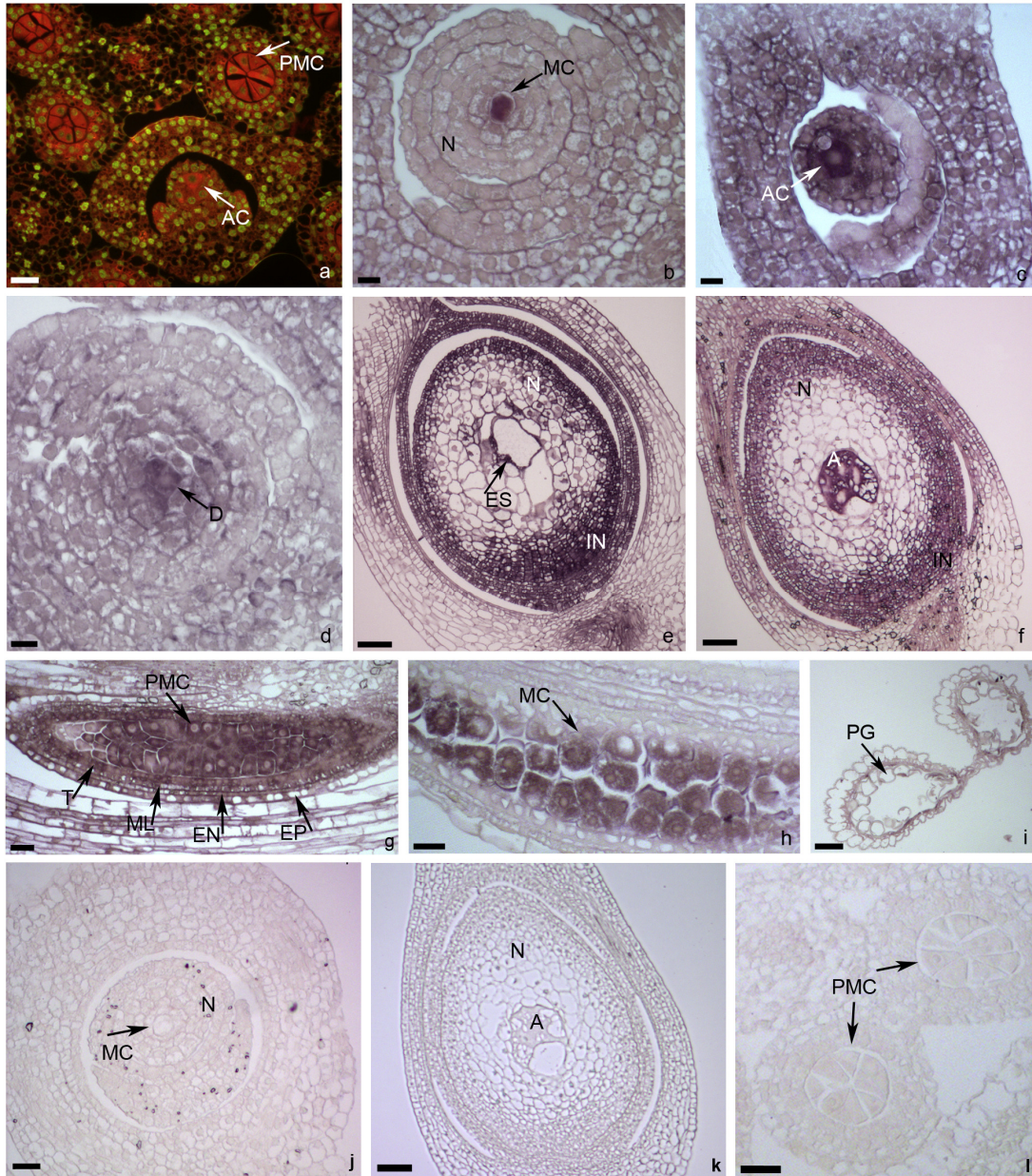


**Figura 9:** Localização da expressão do clone 04 por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha* hibridizadas com sonda senso (b) e anti-senso (b-d) mostrando: **a-** preservação do RNA (laranja) no controle após coloração com laranja de acridina em células do ovário; **b-** ausência de sinal no controle com a sonda senso na sexual na megagametogênese; **c-** na megagametogênese, expressão generalizada no ovário com forte sinal no saco embrionário e tegumento na sexual; **d-** na megagametogênese, sem sinal de hibridização na apomítica. In: tegumento; se: saco embrionário. Barra= 50 µm.

Nas secções dos ovários e anteras após coloração com Laranja de Acridina foi observada a coloração laranja que indica a preservação do RNA nas amostras (Fig. 10a). Hibridização in situ com a sonda anti-senso de *BbrizRPS8* revelou expressão nos ovários de plantas apomíticas e sexuais (Fig. 10b-f). Durante a megasporogênese (Fig.

10b-d), nas plantas apomíticas, sinal forte de hibridização foi observado no meiócito e um sinal mais fraco sinal no nucelo (Fig. 10b). Na planta sexual, a expressão foi generalizada no ovário com forte expressão na célula arqueosporial (Fig. 10c) e na díade (Fig. 10d). Durante a megagametogênese (Fig. 10e-f), sinal de hibridização forte foi observado nos tegumentos, células nucelares e saco embrionário apomítico (Fig. 10e) e nos tegumentos, células nucelares e antípodas nas plantas sexuais. Em anteras das plantas apomíticas e sexuais transcritos foram localizados no início do desenvolvimento com sinal forte na célula mãe do grão de pólen, no tapete e camadas adjacentes (Fig. 10g) e no meiócito (Fig. 10h). Nenhum sinal foi observado no grão de pólen (Fig. 10i). No controle negativo com a sonda senso nenhum sinal de hibridização foi detectado em ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais nos estágios equivalentes de desenvolvimento (Fig. 10j-l). O mesmo padrão de expressão em antera foi observado para *BbrizRPS15a*.



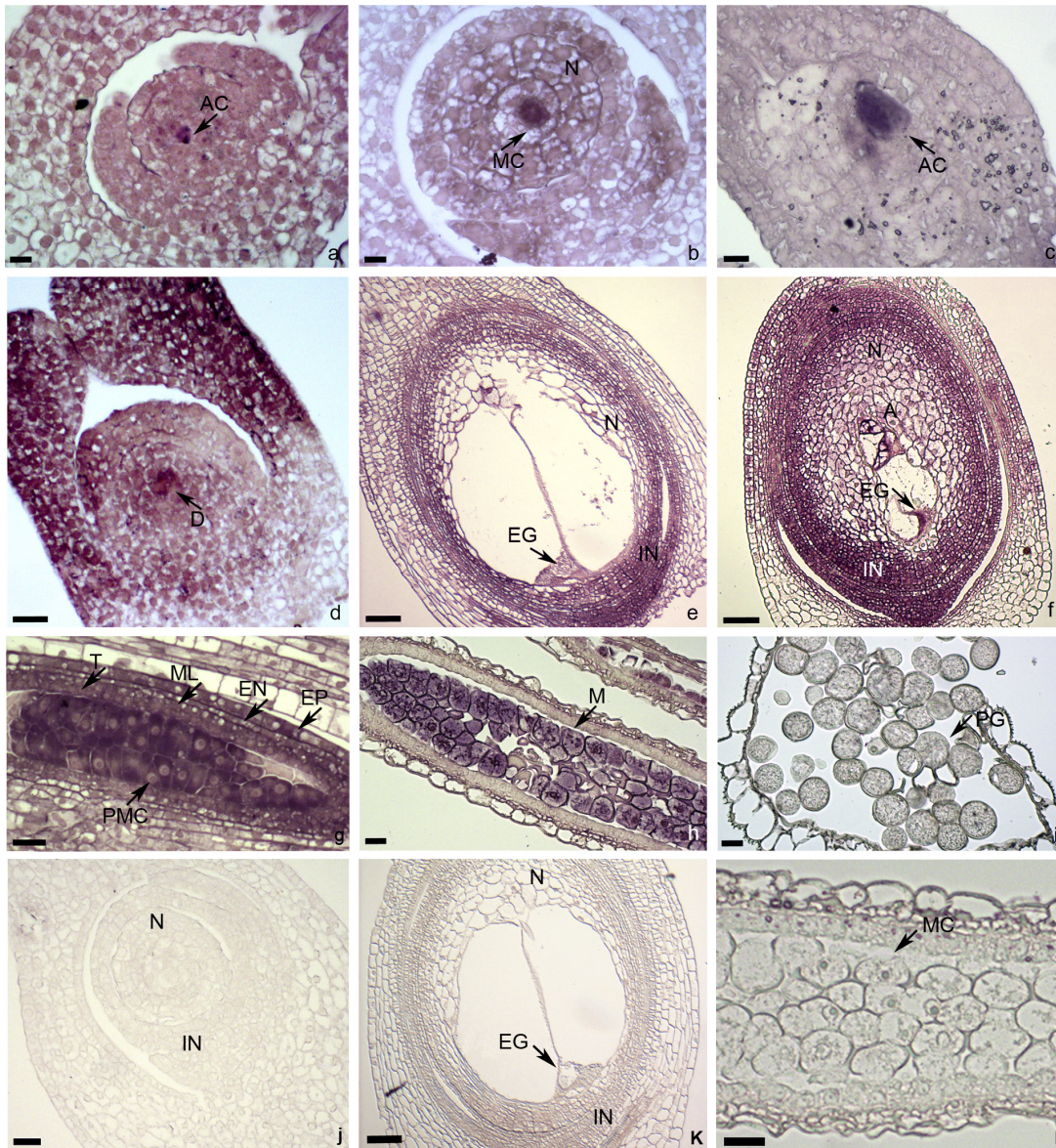


**Figura 10:** Localização da expressão de *BbrizRPS8* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Ovários (a-f, j,k) e anteras (g-i, l) hibridizadas com sonda anti-senso (b-i) e senso (j-l) mostrando: **a**- preservação do RNA (laranja) no controle após coloração com laranja de acridina no citoplasma das células das anteras com a célula mãe do grão de pólen e do ovário com a célula arqueosporial; **b-d** – na megasporogênese, forte sinal no meiócito da apomítica (b) e no ovário com célula arqueosporial (c) e díade (d) da sexual; **e,f**- na megagametogênese, forte sinal de hibridização no saco embrionário, nucelo e tegumentos da apomítica (e) e no saco embrionário, nucelo, tegumentos e antípodas da sexual (f) **g, h**- na microsporogênese, forte sinal em: célula-mãe do grão de pólen, tapete, camada média, endotécio e epiderme da sexual (g) e no meiócito da apomítica (h); **i**- antera madura sem sinal no grão de pólen da apomítica; **j-l**- ausência de sinal no controle com a sonda senso em apomítica na megasporogênese (j); na sexual na



megagametogênese (k) e na apomítica na microsporogênese (l). A: antípodas; AC: célula arqueosporial; D: díade; EN: endotécio; EP: epiderme; ES: saco embrionário; IN: tegumento; MC: meiócito; ML: camada média; N: nucelo; PMC: célula mãe do grão de pólen; PG: grão de pólen; T: tapete. Barra b, c, d = 10 µm; a, g, h, j, l = 20 µm; e, f, i, k = 50 µm.

Para *BbrizRPL41*, a hibridização *in situ* com a sonda anti-senso mostrou expressão em ovários das plantas apomíticas e sexuais (Fig. 11a-f). Durante a megasporogênese, nas plantas apomíticas, transcritos foram observados na célula arqueosporial (Fig. 11a) e meiócito (Fig. 11b) circundado pelo nucelo. Na planta sexual, o sinal foi observado em ovários jovens, principalmente no nucelo e na célula arqueosporial (Fig. 11c) e díade (Fig. 11d). Durante a megagametogênese, na planta apomítica, o sinal foi observado nas células nucelares e tegumentos e um fraco sinal no aparato da oosfera (Fig. 11e). Na planta sexual, forte sinal foi observado no saco embrionário maduro: tegumentos, células nucelares, antípodas e aparato da oosfera (Fig. 11f). Em anteras das plantas apomíticas e sexuais, os transcritos foram observados na célula mãe do grão de pólen, no tapete, camadas adjacentes e micrósporos uninucleados (Fig. 11g-h). Nenhum sinal foi observado no grão de pólen (Fig. 11i). No controle negativo com a sonda senso nenhum sinal de hibridização foi detectado em ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais nos estágios equivalentes de desenvolvimento (Fig. 11j-l).

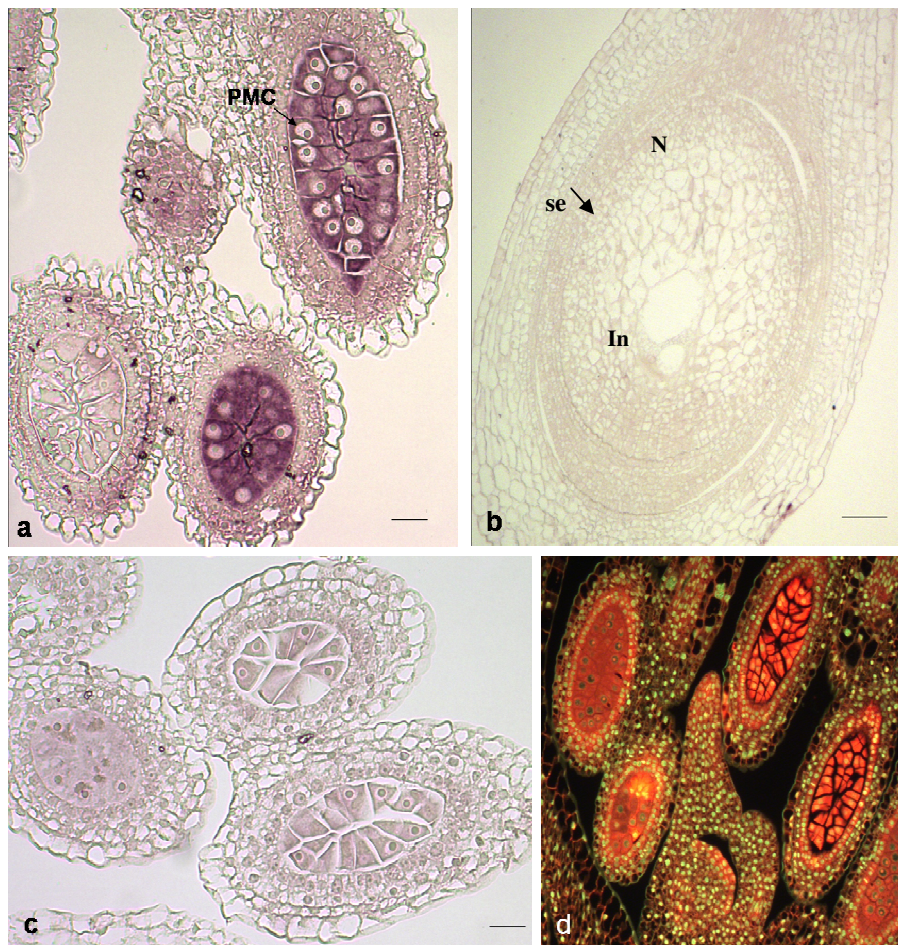


**Figura 11:** Localização da expressão de *BbrizRPL41* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Ovários (a-f, j,k) e anteras (g-i, l) hibridizadas com sonda anti-senso (a-i) e senso (j-l) mostrando: **a-d-** na megasporogênese, hibridização generalizada nos ovários com forte sinal na célula arqueosporial (a) e no meiócito (b) em apomítica e na célula arqueosporial (c) e díade (d) na sexual; **e, f-** na megagametogênese, sinal da hibridização nas células do nucelo e tegumentos, com fraco sinal na oosfera da apomítica (e) e no nucelo, tegumentos e no saco embrionário nas antípodas e aparato da oosfera da sexual (f); **g-i-** na microsporogênese, forte sinal na célula-mãe do grão de pólen, tapete, camada média, endotécio e epiderme (g) e micrósporos uninucleados (h) sem sinal no grão de pólen (i) da sexual; **j-l-** ausência de sinal no controle com a sonda senso em apomítica na megasporogênese (j) e megagametogênese (k) e na sexual na microsporogênese (l). A: antípodas; AC: célula arqueosporial; D: díade; EG: oosfera;



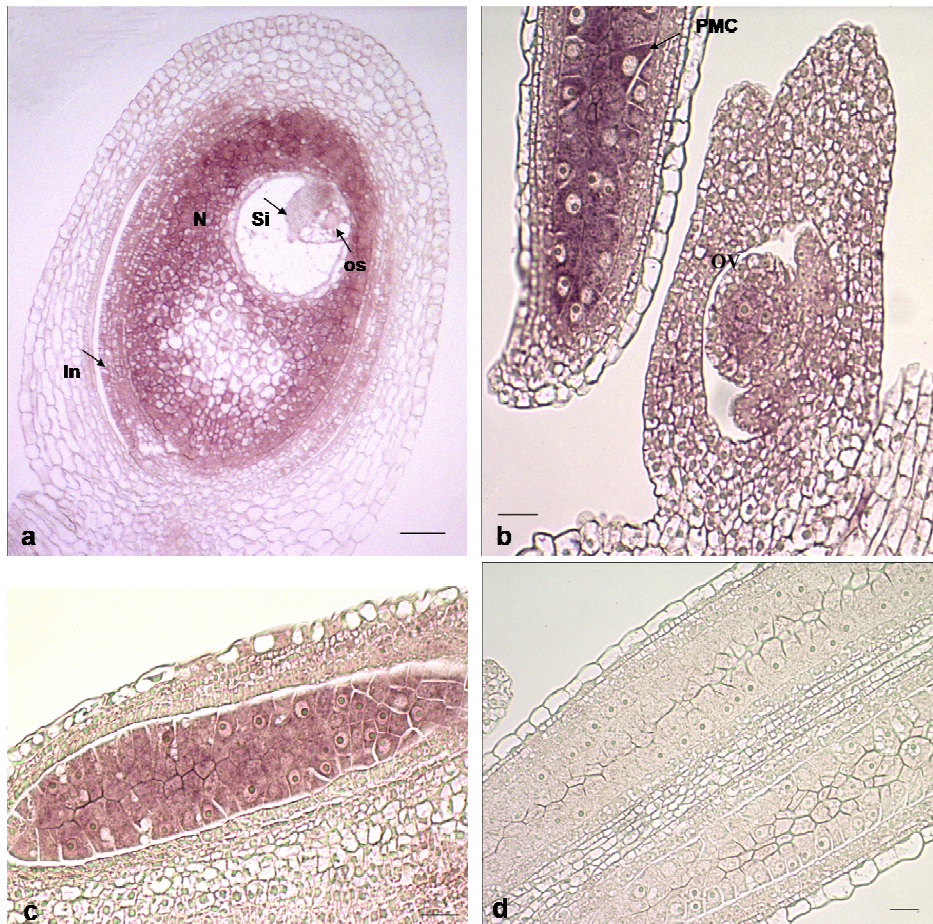
EN: endotécio; EP: epiderme; ES: saco embrionário; IN: tegumento; MC: meiócito; M: micrósporo; ML: camada média; N: nucelo; OV: ovário; PMC: célula mãe do grão de pólen; PG: grão de pólen; T: tapete. Barra a, c, d = 10 µm; g, h, j = 20 µm; e, f, i, k = 50 µm.

A presença do transcrito de *BbrizMMF* foi detectada apenas na célula mãe do grão de pólen nas anteras das plantas apomíticas e sexuais (Fig. 12a). Nenhum sinal foi observado em ovários em nenhum estágio de desenvolvimento em plantas apomíticas ou em plantas sexuais (Fig. 12b), de modo equivalente ao controle realizado com a sonda senso (Fig. 12c). Em teste de coloração com laranja de acridina foi observada a preservação do RNA nas anteras e ovário (Fig. 12d).



**Figura 12:** Localização da expressão de *Bbriz*MMF por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Anteras (a,c,d) e ovários (b) hibridizadas com sonda anti-senso (a,b) e senso (c) mostrando: **a-** na microsporogênese, forte sinal de hibridização nas células-mãe do grão de pólen na sexual; **b-** na megagametogênese, nenhum sinal de hibridização na apomítica; **c-** ausência de sinal no controle com a sonda senso em sexual na microsporogênese; **d** - ovário e anteras após coloração com laranja de acridina mostrando a preservação do RNA (laranja). in: tegumentos, N: nucelo, PMC: célula mãe do pólen, se: saco embrionário. barra a, b, d= 50 µm; c= 20 µm.

Para *Bbriz*Sec13 foi observado sinal de hibridização com a sonda anti-senso nos tegumentos, sinérgide, oosfera e forte sinal no nucelo em ovários em megagametogênese, da planta apomítica (Fig. 13a). Não foi observado sinal de hibridização em ovários de plantas sexuais em nenhum dos estágios testados. Em anteras das plantas apomíticas e sexuais foi observado forte sinal na célula mãe do grão de pólen (Fig. 13b-c). Quando usada a sonda senso nenhum sinal foi observada (Fig. 13d).



**Figura 13:** Localização da expressão de *BbrizSec13* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria brizantha*. Ovários (a,b) e anteras (b,c,d) hibridizadas com sonda anti-senso (a-c) e senso (d) mostrando: **a**- na megagametogênese, expressão nos tegumentos, nucelo e fraco sinal na oosfera e sinérgide na apomítica; **b, c** – na microsporogênese forte sinal na célula-mãe do grão de pólen da sexual (b) e na apomítica (c); **d** - ausência de sinal no controle com a sonda senso em sexual na microsporogênese. in: tegumentos, N: nucelo, Si: sinérgide, Ov: ovário, os: oosfera, PMC: célula mãe do grão de pólen. Barra a= 50 µm; b, c, d= 20 µm.

A tabela 10 apresenta de forma resumida os resultados da análise de similaridade e a análise de expressão por RT-qPCR e hibridização in situ das sete sequências estudadas neste trabalho.

**Tabela 10:** Resumo dos resultados da análise de similaridade por BLAST ([www.ncbi.nlm.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST)) e a análise de expressão por RT-qPCR e hibridização in situ das sequências dos clones 04, 07, *BbrizMMF*, *BbrizSec13*, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*. Apo: apomítica, in situ: hibridização in situ, Sex: sexual, PMC: célula mãe do grão de pólen, qPCR: RT-qPCR.

Clones	Similaridade	Caracterização da Expressão
04	Proteína quinase de ligação a calmodulina	<b>qPCR:</b> Expressão em raízes, anteras e ovários Apo e Sex  <b>In situ:</b> Ovário Sex megagametogênese
07	Proteína quinase cálcio dependente	<b>qPCR:</b> Maior expressão em plantas apomíticas, com alta expressão em folhas
<i>BbrizMMF</i>	Fator de manutenção do cromossomo	<b>In situ:</b> anteras (PMC) Apo e Sex
<i>BbrizSec13</i>	Proteína putativa do tipo Sec13	<b>In situ:</b> Ovário Apo  Antera (PMC) Apo e Sex
<i>BbrizRPS8</i>	Proteína ribossomal S8	<b>qPCR:</b> Expressão em raízes, anteras e ovários  <b>In situ:</b> Desenvolvimento do ovário e início da antera
<i>BbrizRPS15a</i>	Proteína ribossomal S15a	<b>qPCR:</b> Expressão em raízes, ovários e anteras  <b>In situ:</b> Início do desenvolvimento da antera
<i>BbrizRPL41</i>	Proteína ribossomal L41	<b>qPCR:</b> Expressão em ovários, anteras e raízes  <b>In situ:</b> Desenvolvimento do ovário e início da antera



#### **4.5. Estabelecimento da transformação de Arroz e *Arabidopsis* para teste de função dos genes em estudo**

Para testar se as regiões promotoras putativas isoladas de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* seriam suficientes para dirigir a expressão de genes de interesse, estas foram fusionadas ao gene *GUS* e usadas na transformação de arroz e *Arabidopsis* para observar a que tecidos a expressão estaria sendo dirigida.

##### **4.5.1. Arroz cv. Primavera**

###### **4.5.1.1. Efeito da concentração de higromicina no desenvolvimento das unidades embriogênicas de arroz**

O método de transformação de arroz estabelecido foi desenvolvido por (Hiei et al., 1994) e modificado por (Sallaud et al., 2003).

Para experimentos de transformação de arroz, com os promotores isolados de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a*, *BbrizRPL41*, foi necessário estabelecer a concentração de higromicina necessária para seleção das unidades embriogênicas transformadas.

Os resultados da Tabela 11 mostram que o uso da higromicina nas concentrações de 5 mg/L (Fig. 14b) e 10 mg/L (Fig. 14c) não é suficiente para afetar de modo significativo o desenvolvimento das unidades embriogênicas de arroz. Já na concentração de 25 mg/L (Fig. 14d), as unidades embriogênicas demonstram sinais de dificuldade de desenvolvimento, como: diminuição do tamanho e oxidação, quando comparados aos controles. Nas concentrações de 50 mg/L (Fig. 14e) e 100 mg/L (Fig. 14f) o desenvolvimento ficou paralisado.

**Tabela 11:** Efeito da concentração de higromicina no desenvolvimento de unidades embriogênicas de arroz em meio de indução NB básico. MSI - meio de seleção I, C- cefotaxima, T - timetina. Os números indicam a quantidade de unidades embriogênicas.

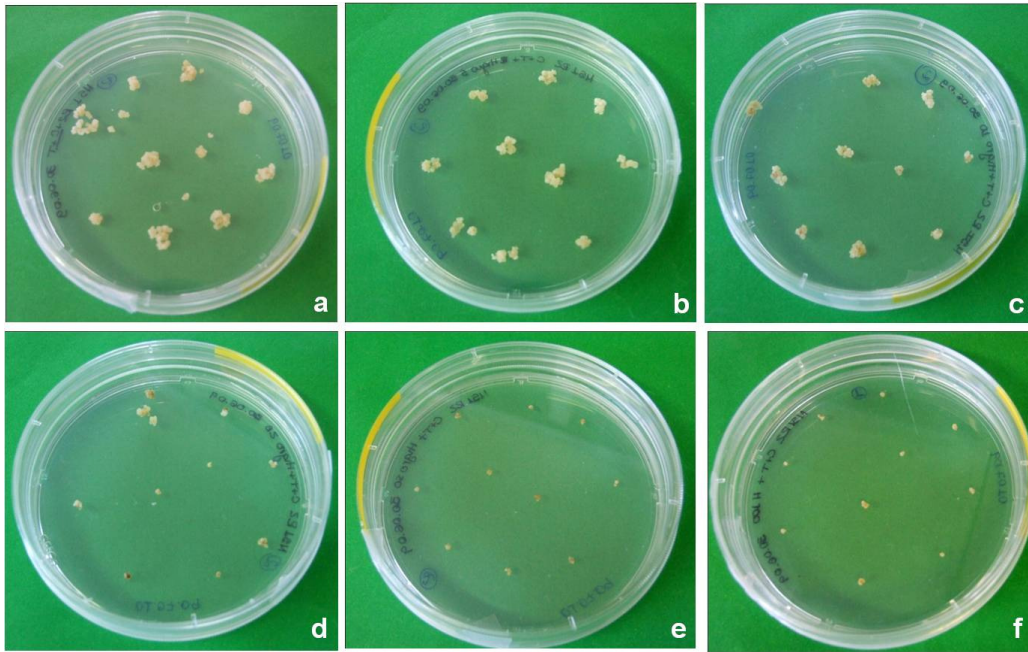
<b>Tempo em meio de seleção</b>	<b>5 dias</b>	<b>9 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>21 dias</b>
<b>MSI</b>	20 + + +	20 + + +	20 + + +	20 + + +
<b>MSI + C + T</b>	20 + + +	20 + + +	20 + + +	20 + + +
<b>MSI + C + T + 5 mg/L Higromicina</b>	21 + + + 9 + +	20 + + + 10 + +	20 + + + 9 + + 1 +	20 + + + 9 + + 1 +
<b>MSI + C + T + 10 mg/L Higromicina</b>	11 + + + 18 + + 1 +	10 + + + 19 + + 1 +	10 + + + 19 + + 1 +	10 + + + 19 + + 1 +
<b>MSI + C + T + 25 mg/L Higromicina</b>	16 + + + 14 + +	7 + + + 23 + +	3 + + + 27 + +	7 + + 23 +
<b>MSI + C + T + 50 mg/L Higromicina</b>	11 + + + 19 + +	4 + + + 26 + +	26 + + 4 +	30 +
<b>MSI + C + T + 100 mg/L Higromicina</b>	5 + + + 15 + +	4 + + + 16 + +	20 +	20 +

Notas atribuídas às unidades embriogênicas (UE) em função do aspecto em cultura: + + + para UE com desenvolvimento normal; + + para UE com desenvolvimento comprometido e + para UE não desenvolvida e oxidada.

Os resultados evidenciam que com cinco dias no meio de seleção I o desenvolvimento das UE já é alterado, quando comparado aos controles sem higromicina. Nas concentrações de 25 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L o desenvolvimento fica mais prejudicado a partir do nono dia, acentuando-se aos 14 dias. A partir do 14º dia não foram observadas maiores alterações no desenvolvimento das UE.

Os dois controles utilizados também não apresentaram diferenças no desenvolvimento das unidades embriogênicas (Tab. 11), evidenciando que os antibióticos cefotaxima (400 mg/L) e timetina (100 mg/L), não interferem no desenvolvimento dos explantes (Fig. 14a).





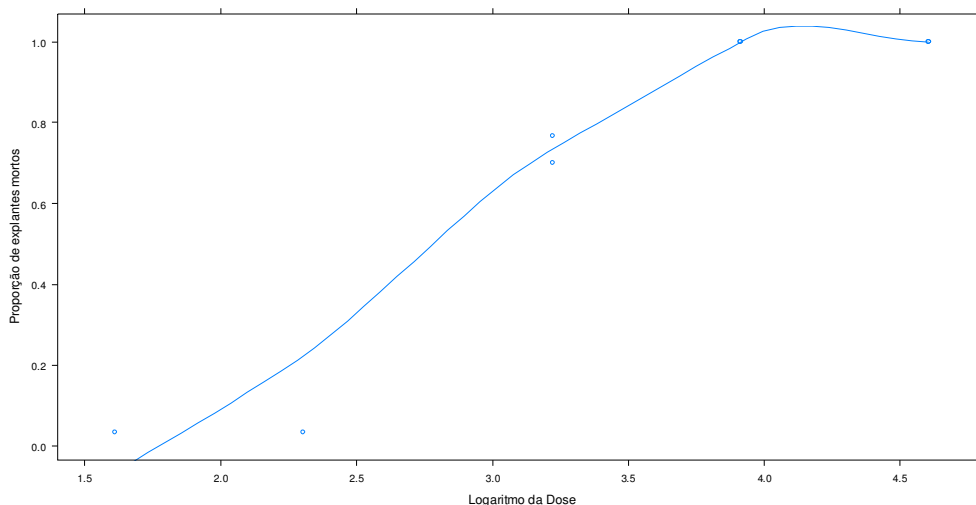
**Figura 14:** Unidades embriogênicas de arroz, *Oryza sativa*, cv. Primavera, em meio MSI (meio de seleção I) suplementado com os antibióticos cefotaxima (400 mg/L) e timetina (100 mg/L), submetidos a diferentes concentrações de higromicina. **a-** Placa controle, sem higromicina. **b-** unidades embriogênicas expostas a concentração de 5 mg/L de higromicina. **c** - concentração de 10 mg/L de higromicina. **d** - concentração de 25 mg/L de higromicina. **e** - concentração de 50 mg/L de higromicina. **f** - concentração de 100 mg/L de higromicina.

#### 4.5.1.2. Análise estatística

O comportamento dos dados experimentais descritos na figura 14 justifica o uso do modelo binomial com função de ligação logística. Com base no modelo ajustado, a Tabela 12 apresenta as doses letais do antibiótico necessárias para matar 50%, 75% e 90% dos explantes. Como foi aplicado o logaritmo neperiano na variável dose do antibiótico, deve-se aplicar a exponencial nessas estimativas para interpretar os reais resultados. Dessa forma, em 5% de significância pode-se afirmar que para matar 50% dos explantes são necessários 13,7 mg/L (e.p= 1.085719358) de higromicina, 20,57 mg/L (e.p=1.081305535) para matar 75% e 30,8 mg/L (e.p =1.099478559) para matar 90% (Fig. 15).

**Tabela 12:** Estimativas das doses letais do antibiótico necessárias para matar 100% dos explantes, segundo o modelo binomial ajustado.

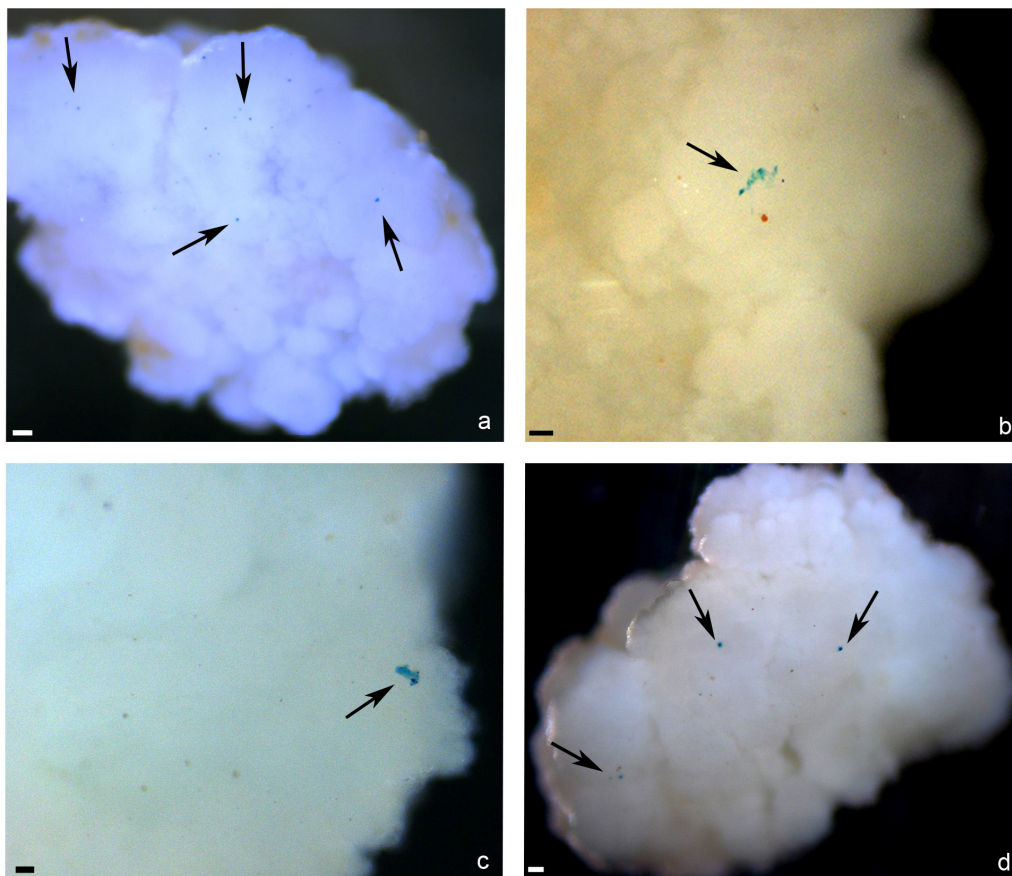
<b>p</b>	<b>Log da Dose</b>	<b>Exponencial da Dose Letal</b>	<b>Erro Padrão do Exponencial da Dose Letal</b>
0.5	2.619476	13.72852795	1.085719358
0.75	3.024178	20.57708339	1.081305535
0.9	3.428880	30.84208027	1.099478559



**Fig. 15** – Proporção de explantes mortos segundo as doses do antibiótico higromicina.

#### 4.5.1.3. Transformação de unidades embriogênicas de arroz

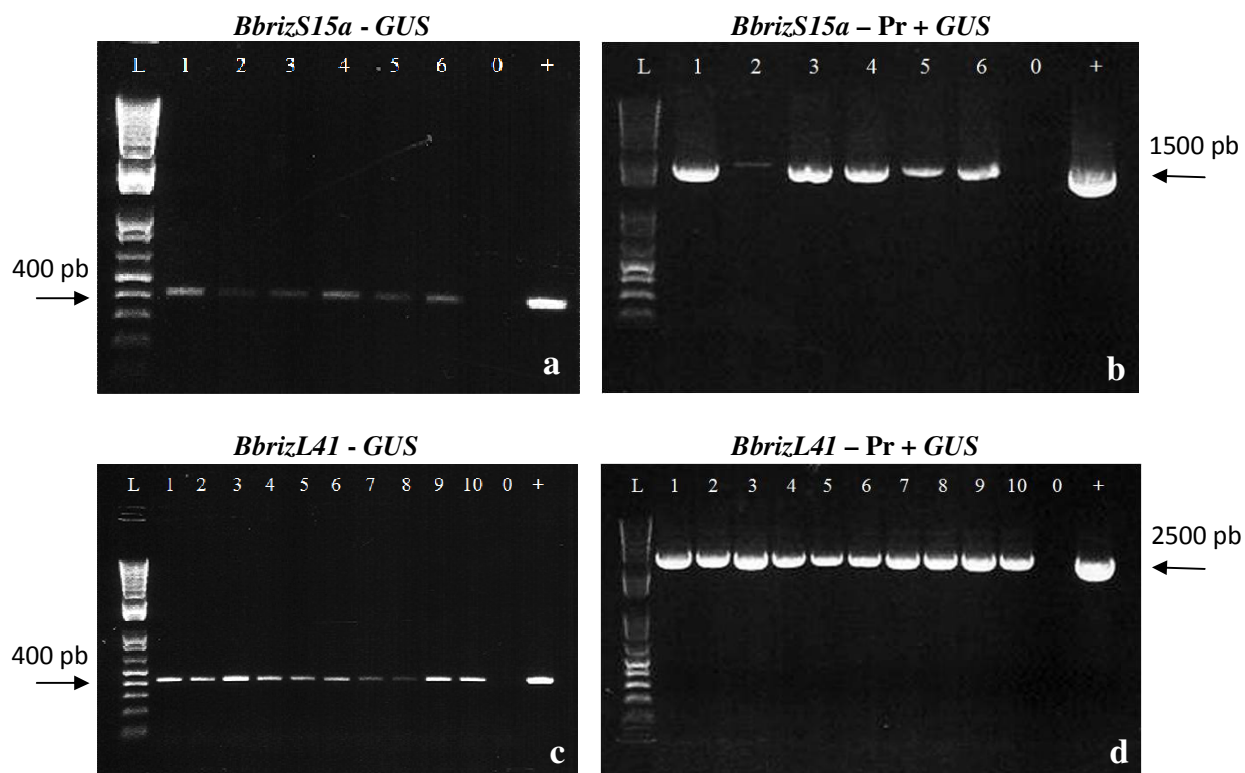
As unidades embriogênicas de arroz foram bombardeadas com vetores contendo os promotores isolados das sequências *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizLA* fusionados ao gene repórter *GUS* e a expressão transiente de *GUS* foi avaliada. Como controle positivo foi usado o vetor pAHC 27 contendo o promotor de ubiquitina de milho, pUbi1 fusionado ao gene *GUS*. Na Figura 16, podem ser observados pontos azuis demonstrando a presença de *GUS* em plantas transgênicas com os quatro vetores utilizados.



**Figura 16:** Expressão do gene *GUS* em calos embriogênicos de arroz cv. Primavera, 24 horas após o bombardeamento de partículas, utilizando as construções: a- pAHC27 (pUbi1::*GUS*) (Christensen et al., 1992), barra: 100  $\mu$ m. b- pBbrizRPS8::*GUS*, barra= 100  $\mu$ m. c- pBbrizRPS15a::*GUS*, barra=50  $\mu$ m e d – pBbrizRPL41::*GUS*, barra= 100  $\mu$ m.

#### 4.5.2. Transformação de *Arabidopsis thaliana*

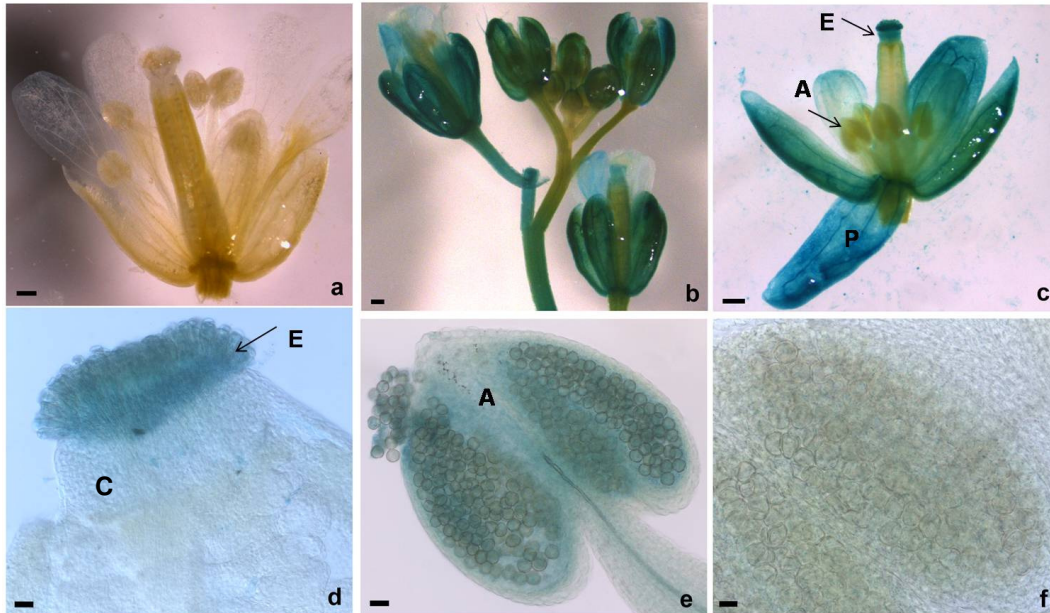
A transformação das plantas foi realizada pelo método de *Floral dip* (Clough et al., 1998) e confirmada pela presença do transgene pBbrizRPS15a::*GUS* e pBbrizRPL41::*GUS* por PCR. Para pBbrizRPS15a::*GUS* foram recuperadas seis plantas e para pBbrizRPL41::*GUS*, dez plantas, em todas foi detectada a presença do gene *GUS* por PCR, fragmento de 400 pb (Fig. 17a e 17c). PCR também foi realizada com iniciadores internos a sequência dos promotores pBbrizRPS15a e pBbrizRPL41 e iniciador para o gene *GUS*, fragmentos de 1.500 pb e 2.500 pb, respectivamente (Fig. 17b e 17d).



**Figura 17:** Eletroforese em gel de agarose 1% apresentando as seqüências amplificadas por PCR das plantas de *A. thaliana* transformadas com pBbrizRPS15a::*GUS* (a-b) e pBbrizRPL41::*GUS* (c-d). As reações foram realizadas com iniciadores pra o gene *GUS* (a e c) e com iniciadores internos aos promotores mais *GUS* (b e d). O número 0 indica a planta não transformada e o símbolo + o controle positivo (plasmídeo), L indica o marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

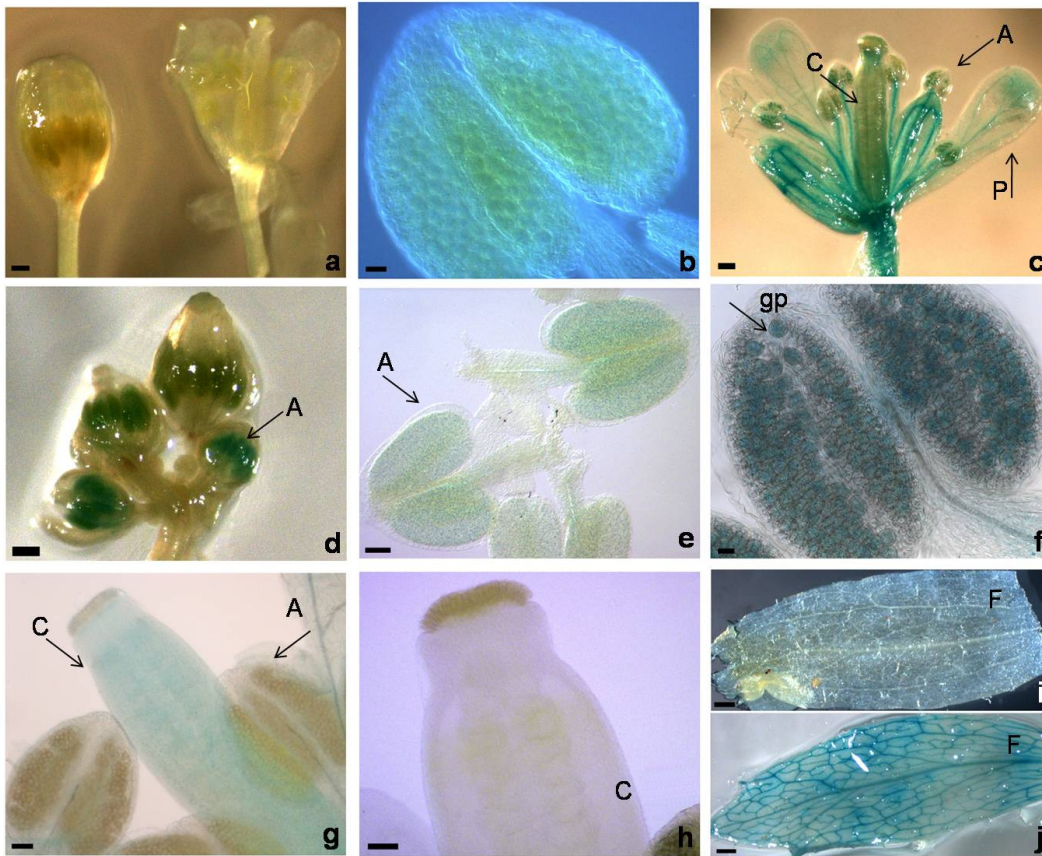
Para localização da expressão do gene *GUS* nas plantas de *A. thaliana*, flores da planta não transformada e da planta transformada foram colocadas em X-Gluc. Na planta não transformada não foi observada a presença de GUS como esperado (Fig. 18a). Das seis plantas transformadas com pBbrizRPS15a::*GUS*, três tiveram suas estruturas analisadas. Dessas, duas plantas apresentaram forte expressão nas pétalas, estigma e anteras (Fig. 18c-e) e uma planta apresentou apenas fraca expressão nas anteras (Fig. 18d).





**Figura 18:** Detecção histoquímica do gene *GUS* em tecido de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com vetor contendo a construção pBbrizRPS15a::*GUS*. **a-** Flor de *A. thaliana* não transformada; barra= 0,2 mm. **b-** Flores fechadas de *A. thaliana* em diferentes estádios de desenvolvimento com forte expressão de *GUS*; barra= 0,2 mm. **c-** Flor aberta de *A. thaliana* com forte expressão de *GUS* nas pétalas e estigma; barra= 0,5 mm. **d-** Carpel, evidenciando o estigma com forte expressão; barra= 10  $\mu$ m. **e-** antera com forte expressão de *GUS*; barra= 20  $\mu$ m. **f-** antera com expressão muito fraca de *GUS*; barra: 10  $\mu$ m. A: antera, C: carpelo, E: estigma, P: pétala.

A expressão do gene *GUS* foi analisada nas plantas transformadas com a construção pBbrizRPL41::*GUS*. Plantas não transformadas foram colocadas em solução de X-Gluc para controle e não foi observada a presença de GUS na flor (Fig. 19a) tampouco nos grãos de pólen dentro das anteras (Fig. 19b). Dez plantas foram recuperadas com diferentes padrões de expressão. Foram observadas três plantas com as flores azuis apresentando forte expressão nas pétalas, filete das anteras e grãos de pólen (Fig. 19c-d). Em seis plantas foi observada expressão generalizada dentro da antera (Fig. 19e) e em três plantas foi observada forte expressão nos grãos de pólen (Fig. 19f). Nas três plantas onde foi observada coloração azul em toda a flor, foi observada também a expressão na parede externa do carpelo (Fig. 19g) nas demais plantas nenhuma expressão foi observada no carpelo (Fig. 19h). Não foi observada expressão nas folhas de plantas não transformada (Fig. 19i) e observada expressão nas veias das folhas das plantas transformadas (Fig. 19j).



**Figura 19:** Detecção histoquímica do gene *GUS* em tecido de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com vetor contendo a construção pBbrizRPL41::*GUS*. **a-** Flores não transformadas de *A. thaliana*; barra= 0,2 mm. **b-** Antera isolada de flor de *A. thaliana* não transformada; barra= 20  $\mu$ m. **c-** Flor aberta de *A.thaliana* com forte expressão de *GUS* nas pétalas, anteras e parte externa do carpelo; barra= 0,2 mm. **d-** Flor fechada evidenciando a forte expressão de *GUS* nas anteras; barra= 0,2 mm. **e-** anteras com expressão de *GUS*; barra= 50  $\mu$ m. **f-** antera com forte expressão de *GUS* nos grãos de pólen; barra=20  $\mu$ m. **g-** carpelo com parte externa azulada e anteras com baixa expressão; barra= 50  $\mu$ m. **h-** carpelo de planta transformada sem expressão de *GUS*; barra= 50  $\mu$ m. **i-** folha de planta não transformada; barra= 0,5 mm. **j-** folha de planta transformada com expressão de *GUS*; barra= 0,5 mm. A: antera, C: carpelo, F: folha, gp: grão de pólen, P: pétala.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho entre os sete cDNAs de alta expressão reportada em ovários de *Brachiaria brizantha*, o clone 04 e o clone 07, apresentaram similaridade com seqüências codificadoras de proteínas quinases que participam das vias de transdução de sinal mediadas por cálcio. O clone 04 possui similaridade com uma proteína quinase (PKC substrate-like - At5g56360) (Reddy et al., 2002) de ligação a calmodulina de *Arabidopsis thaliana* e o clone 07 com proteína similar a proteína quinase cálcio-dependente CPK1 *adapter protein 2* de uva e de arroz. As proteínas quinases dependentes de cálcio (CDKS) são importantes sensores do fluxo de  $Ca^{2+}$  em plantas em resposta a estresse, e seus níveis de expressão são controlados temporal e espacialmente durante o desenvolvimento (Ludwig et al., 2004). Foi observada alta expressão do clone 04 em raízes, seguida de anteras e ovários, e transcritos foram localizados no saco embrionário e tegumentos em ovários em megagametogênese (estádio IV) da planta sexual. Essa alta expressão detectada poderia estar relacionada à alta atividade metabólica das células de órgãos reprodutivos e raízes de *B. brizantha* que ocorre nos tecidos em desenvolvimento. Em tabaco essa associação foi sugerida quando observado acúmulo de proteínas quinases de ligação a calmodulina em tecidos e células que requerem rápido crescimento e atividade metabólica (Zhang et al., 2003).

As proteínas com as quais o clone 07 mostrou similaridade apresentam um domínio conservado SMC\_prok\_A, da proteína de segregação de cromossomo SMC. Essa proteína se liga ao DNA e age na organização e segregação dos cromossomos na divisão celular (Marchler-Bauer et al., 2009). Foi observada maior expressão desse gene em plantas apomíticas em todos os órgãos analisados (ovários, anteras, folhas e raízes). Em experimentos de hibridização *in situ* (Alves, 2007) a expressão do transcrito foi detectada com maior intensidade durante todo o desenvolvimento do óvulo em plantas apomíticas e na megagametogênese das plantas sexuais. O transcrito também foi detectado no receptáculo floral, em estágio anterior à megasporogênese, indicando que o transcrito do clone 07 pode estar envolvido na via de diferenciação floral (Alves, 2007). Esse transcrito foi encontrado em células que estão sujeitas à divisão nuclear como o meiócito, as iniciais apospóricas, o coenócito e as células do nucelo, e ausente nas tétrades e sacos embrionários formados onde o processo de divisão nuclear já foi

estabelecido (Alves, 2007). A maior expressão detectada em ovários das plantas apomíticas por RT-qPCR pode ser devida à sua expressão durante todo desenvolvimento do ovário, em células com alta taxa de divisão celular enquanto que nas plantas sexuais o sinal da hibridização foi detectado apenas nas células do saco embrionário maduro. Comparando a função inferida para o clone 07, as análises de expressão por RT-qPCR e os resultados de hibridização *in situ* (Alves, 2007) pode-se especular que esse gene atue no momento de divisão celular nas células do ovário.

Os clones 09, 10 e 21 de alta expressão detectada em ovários apresentaram similaridade com proteínas ribossomais e parecem ser bem conservados em plantas, com altos níveis de similaridade entre monocotiledôneas. CL09 é similar à proteína ribossomal S8. A sequência gênica que codifica a proteína S8 foi caracterizada em arroz (Nakamura et al., 1995) e pode ter um importante papel na regulação da síntese de proteínas em células eucarióticas. CL10 mostrou alta similaridade com proteínas da família de proteínas ribossomais S15a de milho e *Arabidopsis thaliana* (Hulm et al., 2005), especialmente com a isoforma RPS15aF. CL21 é similar à proteína ribossomal L41, que é considerada a menor e mais básica proteína em eucariotos, composta apenas por 25 aminoácidos, sendo que 17 são argininas ou lisinas (Yu et al., 2001). Em *Hordeum vulgare* os genes codificadores de S8 e a L41 apresentaram também maior expressão em estruturas florais, lema e pálea, do que em folha (Abebe et al., 2004). Após as análises de similaridade os clones 09, 10 e 21 foram renomeados para *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPLA1*, respectivamente. Motivos regulatórios relacionados à auxina foram identificados na região promotora putativa dos três genes ribossomais, sugerindo uma possível associação da alta expressão em ovários com a alta atividade mitótica nesse órgão. Isso poderia explicar também a alta atividade detectada em anteras e especialmente nas pontas de raiz, já que a auxina possui importante papel na indução da divisão celular (Perrot-Rechenmann, 2010).

Os três genes, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPLA1*, mostraram reduzida expressão em folhas. Embora alta expressão tenha sido observada em anteras, não foram detectados transcritos no pólen maduro por hibridização *in situ*, a expressão observada em antera pode ser principalmente devida aos transcritos presentes durante os eventos iniciais de desenvolvimento da antera. Consistente com isso, um estudo de perfil de transcrição em grande escala feito em *Brassica napus* mostrou que folhas e pólen maduro apresentam os mais baixos níveis de transcritos dos genes que codificam



proteínas ribossomais, sugerindo que um reduzido número de transcritos é suficiente para suportar o crescimento e desenvolvimento desses tecidos e alta fração desses transcritos foi observada em tecidos reprodutivos (Whittle et al., 2009b).

A alta expressão de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*, em órgãos reprodutivos comparado a folhas é consistente com resultados obtidos da expressão de genes de outras proteínas ribossomais envolvidas no desenvolvimento de plantas e do gametófito feminino (Skinner et al., 2001; Hulm et al., 2005; Shi et al., 2005; Whittle et al., 2009b). Em *A. thaliana* foi observado que o gene *RPS15aF*, similar a *BbrizRPS15a*, apresenta abundância de transcritos em tecidos mitoticamente ativos: gemas seguidas de flores, carpelos e raízes, com baixo nível de transcritos em folhas e brácteas (Hulm et al., 2005).

Em *B. napus*, a quantidade de transcritos de genes codificadores de proteínas ribossomais varia entre tecidos, com elevada fração do transcriptoma presente em células altamente especializadas e diferenciadas, como micrósporos e células do embrião e óvulos (Whittle et al., 2009a; Whittle et al., 2009b). Micrósporos e óvulos co-expressam vários transcritos que codificam proteínas ribossomais. Especula-se que essas células compartilhem vias moleculares que contribuem para a capacidade de se diferenciarem em embrião (Whittle et al., 2009a). Em *B. brizantha*, transcritos do *BbrizRPS8* e *BbrizRPL41* foram localizados em ovários desde o início do desenvolvimento até a maturação em plantas apomíticas e sexuais. Os transcritos foram muito abundantes em meiócitos, células em meiose, em ovários e anteras. Em tecidos em crescimento no óvulo como nucelo, tegumentos e antípodas, a expressão dos *BbrizRPS8* e *BbrizRPL41* é consistente com sítios ativos de síntese de proteínas. Esses achados não excluem a possibilidade desses genes apresentarem uma função extrarribossomal relacionada ao desenvolvimento do gametófito. Estudos recentes com mutações em genes envolvidos na biogênese dos ribossomos mostram seu papel crucial no desenvolvimento do gametófito feminino em *Arabidopsis*. A mutação desses genes leva ao atraso da progressão mitótica no ciclo celular de células do gametófito (Shi et al., 2005; Shi et al., 2011). O gene *Huellenlos* de *Arabidopsis* que codifica uma proteína ribossomal mitocondrial L14, está envolvido no controle do crescimento do tegumento, no desenvolvimento do saco embrionário e na prevenção da morte celular (Schneitz et al., 1998; Skinner et al., 2001). O gene *NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 1* codifica um proteína ribossomal mitocondrial RPLM21 em *Arabidopsis* e o saco embrionário do

mutante *nfd1* apresenta defeito na cariogamia durante a fertilização na oosfera e na célula central (Portereiko et al., 2006).

Em anteras, a localização do transcrito *BbrizRPS15a* foi similar ao *BbrizRPS8* e *BbrizRPL41*, com forte sinal nos meiócitos. Em ovários de plantas sexuais, embora a expressão de *BbrizRPS15a* ter sido detectada por RT-qPCR, a presença dos transcritos não foi observada por hibridização in situ (Alves, 2007), talvez como uma consequência da sensibilidade das condições experimentais da hibridização. A expressão do *BbrizRPS15a* foi observada apenas nas sinérgides das plantas apomíticas (Alves, 2007). Outras duas sequências, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK*, também foram diferencialmente expressas em sinérgides de plantas apomíticas quando comparadas a plantas sexuais, apontando para diferenças no perfil de transcrição localizado na base das sinérgides de plantas apomíticas (Alves et al., 2007). A identificação de EST em sinérgides de plantas apomíticas, sugere um provável papel no desenvolvimento autônomo da oosfera (Alves et al., 2007). Sinérgides estão envolvidas na atração e orientação do tubo polínico durante a fertilização (Van Went et al., 1984; Higashiyama, 2002). Em sinérgides, a abundância de cálcio é fortemente relacionada com a entrada do tubo polínico no saco embrionário (Ge et al., 2007) e proteínas ribossomais, incluindo RPS8 e RPS15a, foram identificadas como proteínas de ligação a  $Ca^{2+}$ /calmodulina em estudo do proteoma humano (Shen et al., 2005). Ao nosso conhecimento essa função não foi ainda investigada em plantas. Podemos indagar sobre a existência de associação entre o metabolismo de  $Ca^{2+}$  e a expressão específica em sinérgide do *BbrizRPS15a*, que é similar a RPS15a.

*BbrizMMF*, similar ao Fator de manutenção do cromossomo de *Triticum aestivum*, que está relacionado com a regulação do ciclo celular, apresentou maior expressão em ovários da planta apomítica do que da sexual com baixa expressão em anteras e folhas (Silveira et al., 2012). Em experimentos de hibridização in situ não foi possível detectar a presença do transcrito nos ovários nas nossas condições experimentais, o transcrito foi detectado apenas na célula-mãe do grão de pólen (CMP) nas anteras das plantas apomíticas e sexuais. A CMP está se preparando para entrar em meiose, a presença dos fatores de manutenção do cromossomo que se ligam a cromatina pode estar relacionada ao controle da replicação do DNA no início da meiose.

*BbrizSec13*, similar ao gene codificador da proteína putativa do tipo Sec13 de *Oryza sativa* (japonica cultivar group) foi detectado em ovários de plantas apomíticas,

principalmente no estágio onde ocorre a diferenciação das iniciais apospóricas (Silveira et al., 2012). Em hibridização *in situ* foi observado sinal nos tegumentos, sinérgides e forte sinal no nucelo em ovários na megagametogênese da planta apomítica. Em anteras das plantas apomíticas e sexuais foi observado forte sinal na célula-mãe do grão de pólen. A presença de *BbrizSec13* nesses tecidos e células pode ser devida ao transporte de proteínas relacionadas à especificação celular (Silveira et al., 2012).

A presença dos transcritos dos clones 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* de *B. brizantha* foi observada em tecidos reprodutivos de arroz cv. Primavera, mostrando que trabalhos de transformação genética em arroz para localização da expressão desses genes em ovários são viáveis.

Para validação das regiões promotoras putativas de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* transformação de plantas modelo, arroz e *Arabidopsis*, foram realizadas. Foram necessários ajustes no método de transformação de arroz, pela utilização do cv Primavera como o estabelecimento da concentração de 20 mg/L do antibiótico higromicina para seleção das unidades embriogênicas.

A concentração de agentes seletivos deve ser estabelecida a cada genótipo e explante utilizado. Por exemplo, Hiei et al. (1994) mostraram que a concentração ideal foi de 50 mg/L de higromicina para seleção de calos derivados de escutelo de três diferentes cultivares de arroz, *Oryza sativa* L. Tsukinohikari, Asanohikari e Koshihikari. Outros trabalhos de transformação de arroz, com diferentes cultivares, usando calos derivados de escutelo, usam as concentrações de 40mg/L (Choi et al., 2003) e 50 mg/L (Sallaud et al., 2003; Al-Forkan et al., 2004).

A eficiência da resposta de desintoxicação ao antibiótico depende do promotor usado para dirigir a expressão do gene de resistência ao agente seletivo. As unidades embriogênicas (UE) de arroz foram transformadas por biobalística e as atividades dos promotores p*BbrizRPS8*, p*BbrizRPS15a* e p*BbrizRPL41* foram verificadas por expressão transiente do gene *GUS*, pontos azuis foram visualizados demonstrando a presença de *GUS* nas UE com os três promotores utilizados.

Como foi observada em *B. brizantha* expressão equivalente de *BbrizRPS8* e *BbrizRPL41* em ovários e em anteras, foi iniciada estratégia de transformação de plantas para analisar a capacidade da região promotora putativa desses genes de dirigir a expressão de genes repórteres. Devido ao tempo necessário à análise da expressão de genes em ovários e anteras de plantas de arroz, promotores foram validados em flores

de *A. thaliana*, de ciclo mais curto. Foi observado diferente padrão de expressão nas plantas transgênicas obtidas. Em quatro plantas a expressão foi observada apenas nas anteras, com forte expressão no grão de pólen, em duas plantas a expressão permaneceu nos mesmos órgãos, mas em menor intensidade e em três outras plantas, além das anteras, foi observada expressão nas pétalas, filetes das anteras e parte externa do carpelo. Essa variação no padrão de expressão entre as plantas transformadas pode ser atribuída ao efeito de inserção posicional e/ou ao número de cópias integradas ao genoma de *A. thaliana* (Mitsuhara et al., 1996; Swapna et al., 2011) que não foi ainda verificado. A alta expressão de *GUS* em anteras pode ser devida aos vários motivos de expressão em pólen encontrados nos promotores pBbrizRPS15a e pBbrizRPL41. Embora em sistemas heterólogos a intensidade e localização da atividade do promotor poderem ser diferentes, estes sistemas são adequados e muito utilizados para testar a capacidade da sequência 5´a montante da região codificadora em dirigir a expressão desta região, como realizado neste trabalho. Monocotiledôneas e dicotiledôneas possuem diferenças na especificidade da expressão gênica. Isso pode ser devido à existência de diferentes fatores de transcrição dessas plantas ou a elementos regulatórios localizados fora da região promotora necessários para a expressão específica (Mitsuhara et al., 1996; Swapna et al., 2011). Já foi observado que íntrons, principalmente o primeiro, podem conter sítios de ligação de fatores de transcrição capazes de aumentar a expressão gênica e são responsáveis pela expressão específica em alguns tecidos ou durante o desenvolvimento (Morello et al., 2008). Para *BbrizRPS8* e *BbrizRPS15a* o primeiro íntron foi detectado e sua atuação na atividade do promotor deverá ser testada posteriormente.

Neste trabalho foram caracterizadas sete sequências de forte expressão em órgãos reprodutivos de *B. brizantha*, entre elas apenas o clone 07 apresentou alta expressão em folhas. A expressão de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* foi observada em células em meiose, em tecido do óvulo em crescimento e raiz, todos com ativa síntese de proteínas, consistente com a expressão de outros genes que codificam proteínas ribossomais em outras plantas. A expressão do *BbrizRPS15a* em sinérgides de plantas apomíticas pode estar relacionada ao desenvolvimento autônomo da oosfera não reduzida. O padrão de expressão similar de *BbrizRPS8* e *BbrizRPL41* sugerem que esses genes podem estar envolvidos em atividades que regulam o crescimento e desenvolvimento de ovários e anteras, independente do modo de reprodução.

Regiões promotoras desses genes foram isoladas e suas atividades foram verificadas pela expressão transiente do gene *GUS* e serão de grande interesse para expressão de genes candidatos em plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As análises dos resultados obtidos neste trabalho levam às seguintes principais conclusões.

- ✓ O clone 04 é similar á proteína quinase de ligação a calmodulina de *Arabidopsis thaliana*; o clone 07 é similar á proteína quinase cálcio-dependente CPK1 *adapter protein 2* e o clone 10 é similar á proteína ribossomal S15a.
- ✓ As sequências codificadoras completas e as sequência promotoras putativas foram identificadas para *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*.
- ✓ Os clone 04, clone 07, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* têm expressão preferencial nos órgãos reprodutivos e raízes de *B. brizantha*. A expressão do clone 07 é generalizada nos órgãos analisados.
- ✓ A expressão de *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41*, observada em células em meiose, em tecido do óvulo em crescimento e raiz, é consistente com a expressão de outros genes que codificam proteínas ribossomais em outras plantas.
- ✓ O padrão de expressão similar de *BbrizS8* e *BbrizL41* sugerem que esses genes podem estar envolvidos em atividades que regulam o crescimento e desenvolvimento de ovários e anteras, independente do modo de reprodução.
- ✓ A presença dos transcritos dos clones 04, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* de *B. brizantha* foi detectada em tecidos reprodutivos de arroz cv. Primavera.
- ✓ Concentrações de higromicina de 20 mg/L são suficientes para seleção de unidades embriogênicas de arroz cv. Primavera.

- ✓ Os promotores isolados das sequências *BbrizRPS15a* e *BbrizRPL41* são capazes de dirigir a expressão do gene *GUS* em unidades embriogênicas de arroz e plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- ✓ Transformação de plantas de arroz cv. Primavera com os promotores pBbrizRPS8, pBrizRPS15a e pBrizRPL41 direcionando a expressão de gene repórter em órgãos reprodutivos poderão ser testadas para determinar seu potencial de utilização na transformação de monocotiledôneas.
- ✓ A influência do primeiro íntron na atividade dos promotores pBbrizRPS8 e pBrizS15a será testada em plantas de arroz cv. Primavera e *Arabidopsis thaliana*.
- ✓ Foi isolado o promotor do gene *BbrizRPS15a* com forte expressão em sinérgides de plantas apomíticas.
- ✓ **Neste trabalho foram isolados os primeiros promotores de *Brachiaria brizantha* que serão de grande interesse para expressão gênica em plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*.**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, T.; SKADSEN, R. W.; KAEPLER, H. F. Cloning and identification of highly expressed genes in barley lemma and palea. **Crop Sci.**, v.44, n.3, p.942-950, 2004.

AL-FORKAN, M. P., J.B.; PAUL ANTHONY; LOWE, K. C. D., R.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of bangladeshi indica rices. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v.9, n.2, p. 287 - 300, 2004.

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

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

ALVES, E. R. **Localização da expressão de genes durante o desenvolvimento de ovários de plantas *Brachiaria brizantha* sexual e apomítica.** (Tese de Doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.164 p.

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

ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. In situ localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. **Protoplasma**, v.231, n.3, p.161-171, 2007.

APG, An ordinal classification for the families of flowering plants. **Ann. Mo. Bot. Gard.**, v. 85, p.531-553, 1998.

ARAUJO, A. C. G.; FALCÃO, R.; CARNEIRO, V. T. C. Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). **Sex. Plant Reprod.**, v.in press, 2007.

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). **Rév Cytol Biol Vég Bot T**, v.XXIII, n.1-2, p.13-28, 2000.

ARAUJO, A. C. G.; NOBREGA, J. M.; POZZOBON, M. T.; CARNEIRO, V. T. C. Evidence of sexuality in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) artificial tetraploid plants and progeny. **Euphytica**, v.144, n.1-2, p.39-50, 2005.



ARMENTA-MEDINA, A.; DEMESA-ARÉVALO, E.; VIELLE-CALZADA, J.-P. Epigenetic control of cell specification during female gametogenesis. **Sex. Plant Reprod.**, v.24, n.2, p.137-147, 2011.

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

BERGER, S. L. Preparation and characterization of RNA: overview. In: (Ed.). **Guide to Molecular cloning techniques**. San Diego, California, v.152, 1987. (Methods in Enzymology).

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

BURKE, T. J.; CALLIS, J.; VIESTRA, R. D. Characterization of a polyubiquitin gene from *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.**, v.213, p.435-443, 1988.

BYRNE, M. E. A role for the ribosome in development. **Trends Plant Sci.**, v.14, n.9, p.512-519, 2009.

CABRAL, G.; CARNEIRO, V.; LACERDA, A.; DO VALLE, C.; MARTINELLI, A.; DUSI, D. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. **Plant Cell Tiss. Org.**, v.107, n.2, p.271-282, 2011.

CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. **Biol. J. Linn. Soc.**, v.61, n.1, p.51 – 94, 1997.

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

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.25, p.36-42, 2002.

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

CHASE, M.W. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 161, p.105-121, 2009.

CHEN, L.; GUAN, L.; SEO, M.; HOFFMANN, F.; ADACHI, T. Developmental expression of ASG-1 during gametogenesis in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). **J. Plant Physiol.**, v.162, n.10, p.1141-1148, 2005.

- CHOI, D.; LEE, Y.; CHO, H.-T.; KENDE, H. Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants. **Plant Cell**, v.15, n.6, p.1386-1398, 2003.
- CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Mol. Biol.**, v. 18, n.4, p.675-689, 1992.
- CHU, C. C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. **In Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Peking: Science Press.**, p.43-50, 1978.
- CHRISTOU, P. Rice transformation: bombardment. **Plant Mol. Biol.**, v. 35, p. 197–203, 1997.
- CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v.16, n.6, p.735-743, 1998.
- DELSENY, M.; SALSES, J.; COOKE, R.; SALLAUD, C.; REGAD, F.; LAGODA, P.; GUIDERDONI, E.; VENDELON, M.; BRUGIDOU, C.; GHESQUIÈRE, A. Rice genomics: Present and future. **Plant Physiol. Biochem.**, v.39, n.3-4, p.323-334, 2001.
- DUJARDIN, M.; HANNA, W. Microsporogenesis, reproductive behavior, and fertility in five *Pennisetum* species. **TAG**, v. 67, n.2, p.197-201, 1984.
- DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.**, v.41, p.151 - 162, 1999.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Res.**, v.8, n.3, p.175-185, 1998.
- FRASER, P. D.; ROMER, S.; SHIPTON, C. A.; MILLS, P. B.; KIANO, J. W.; MISAWA, N.; DRAKE, R. G.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P. M. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.99, n.2, p.1092-1097, 2002.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell. Res.**, v.50, n.1, p.151-158, 1968.
- GE, L. L.; TIAN, H. Q.; RUSSELL, S. D. Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. **Am. J. Bot.**, v.94, n.6, p.1046-1060, 2007.
- GUILLEY, H.; DUDLEY, R. K.; JONARD, G.; BALAZS, E.; RICHARDS, K. E. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcription. **Cell**, v.30, p.763-773, 1982.

- HANANIA, U.; VELCHEVA, M.; SAHAR, N.; FLAISHMAN, M.; OR, E.; DGANI, O.; PERL, A. Suppression and overexpression of ubiquitin extension protein S27a affects cell proliferation and in vitro regeneration in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Sci.**, v.176, n.4, p.566-574, 2009.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant J.**, v.6, p.271-282, 1994.
- HIGASHIYAMA, T. The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization. **J. Plant Res.**, v.115, n.2, p.0149-0160, 2002.
- HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; HIGO, H. PLACE: A database of plant cis-acting regulatory DNA elements. **Nucleic Acids Res.**, v.26, n.1, p.358-359, 1998.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, v. 9, 868-877, 1999.
- HULM, J. L.; MCINTOSH, K. B.; BONHAM-SMITH, P. C. Variation in transcript abundance among the four members of the *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S15a gene family. **Plant Sci.**, v.169, n.1, p.267-278, 2005.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v. 436, p. 793-800, 2005.
- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.345, n.2, p.646-651, 2006.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO J.**, v.6, n.13, p.3901-3907, 1987.
- JOHNSTON, A.; MEIER, P.; GHEYSELINCK, J.; WUEST, S.; FEDERER, M.; SCHLAGENHAUF, E.; BECKER, J.; GROSSNIKLAUS, U. Genetic subtraction profiling identifies genes essential for *Arabidopsis* reproduction and reveals interaction between the female gametophyte and the maternal sporophyte. **Genome Biol.**, v.8, n.10, p.R204, 2007.
- KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: (Ed.). **Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement** Cali, Colombia: CIAT, v.1, 1996. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections, p.258
- KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R. A.; CHAUDHURY, A. M. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiol.**, v.108, n.4, p.1345-1352, 1995.

LACERDA, A. L. M. *Brachiaria brizantha*: caracterização de cDNA de ovários e identificação de explantes para transformação via biobalística. (Mestrado em Biologia Molecular). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2007. 96 p.

LAPOINTE, S. L.; MILES, J. W. Germplasm case study: *Brachiaria* species. In: CIAT (Ed.). **Pastures for the tropical lowlands**, 1992. Germplasm case study: *Brachiaria* species, p.43-55

LENIS-MANZANO, S. J.; ARAUJO, A. C. G. D.; VALLE, C. B. D.; SANTANA, E. D. F. T.; CARNEIRO, V. T. D. C. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. **Pesq. Agropecu. Bras.**, v.45, p.435-441, 2010.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. In: E. R. Ltda. (Ed.). **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro, 2002, p.1084

LUDWIG, A. A.; ROMEIS, T.; JONES, J. D. G. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. **J. Exp. Bot.**, v.55, n.395, p.181-188, 2004.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HE, S.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C. J.; LIEBERT, C. A.; LIU, C.; LU, F.; LU, S.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; SONG, J. S.; TASNEEM, A.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHANG, N.; BRYANT, S. H. CDD: specific functional annotation with the conserved domain database. **Nucl. Acids Res.**, v.37, n.suppl\_1, p.D205-210, 2009.

MARTÍNEZ, E. J.; URBANI, M. H.; QUARIN, C. L.; ORTIZ, J. P. A. Inheritance of Apospory in Bahiagrass, *Paspalum Notatum*. **Hereditas**, v.135, n.1, p.19-25, 2001.

MARTON, M. L.; CORDTS, S.; BROADHVEST, J.; DRESSELHAUS, T. Micropylar Pollen Tube Guidance by *Egg Apparatus 1* of Maize. **Science**, v.307, n.5709, p.573-576, 2005.

MATZK, F.; PRODANOVIC, S.; BAUMLEIN, H.; SCHUBERT, I. The inheritance of apomixis in *Poa pratensis* confirms a five locus model with differences in gene expressivity and penetrance. **Plant Cell**, v.17, n.1, p.13-24, 2005.

MCELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. **Plant Cell**, v.2, p.163-171, 1990.

MCLINTOSH, K. B.; BONHAM-SMITH, P. C. Ribosomal protein gene regulation: what about plants? **Can. J. Bot.**, v.84, p.342-362, 2006.

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

MITSUHARA, I.; UGAKI, M.; HIROCHIKA, H.; OHSHIMA, M.; MURAKAMI, T.; GOTOH, Y.; KATAYOSE, Y.; NAKAMURA, S.; HONKURA, R.; NISHIMIYA, S.; UENO, K.; MOCHIZUKI, A.; TANIMOTO, H.; TSUGAWA, H.; OTSUKI, Y.; OHASHI, Y. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. **Plant Cell Physiol.**, v.37, n.1, p.49-59, 1996.

MORELLO, L.; BREVIARIO, D. Plant spliceosomal introns: Not Only Cut and Paste. **Curr. Genomics**, v.9, p.227-238, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-497, 1962.

NAKAMURA, I.; KAMEYA, N.; AOKI, T.; TADA, T.; NORITA, E.; KANZAKI, H.; UCHIMIYA, H. Nucleotide sequence of a rice cDNA encoding a homolog of the eukaryotic ribosomal protein S8. **Plant Physiol.**, v.107, n.4, p.1463-1464, 1995.

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

OHIRA K., O. K.; FUJIWARA A. Studies on the nutrition of rice cell culture. A simple defined medium for rapid growth in suspension culture. **Plant & Cell Physiol.**, v.14, p.1113-1121, 1973.

OHNISHI, T.; TAKANASHI, H.; MOGI, M.; TAKAHASHI, H.; KIKUCHI, S.; YANO, K.; OKAMOTO, T.; FUJITA, M.; KURATA, N.; TSUTSUMI, N. Distinct gene expression profiles in egg and synergid cells of rice as revealed by cell type-specific microarrays. **Plant Physiol.**, v.155, n.2, p.881-891, 2011.

PAINE, J. A.; SHIPTON, C. A.; CHAGGAR, S.; HOWELLS, R. M.; KENNEDY, M. J.; VERNON, G.; WRIGHT, S. Y.; HINCHLIFFE, E.; ADAMS, J. L.; SILVERSTONE, A. L.; DRAKE, R. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. **Nat Biotech.**, v.23, n.4, p.482-487, 2005.

PERROT-RECHENMANN, C. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, n.5, p.1-15, 2010.

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

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

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

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

PORTEREIKO, M. F.; SANDAKLIE-NIKOLOVA, L.; LLOYD, A.; DEVER, C. A.; OTSUGA, D.; DREWS, G. N. NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 Encodes the *Arabidopsis* RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. **Plant Physiol.**, v.141, n.3, July 1, 2006, p.957-965, 2006.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.40, n.1, p.1-22, 2004.

QUARIN, C. L.; FRANCISCO, E.; ERIC, J. M.; SILVINA, C. P.; OSCAR, A. B. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sex. Plant Reprod.**, v. 13, n.5, p.243-249, 2001.

REDDY, V. S.; ALI, G. S.; REDDY, A. S. N. Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* Genome. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.12, p.9840-9852, 2002.

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

SALARIATO, D.; MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Ornamentation pattern of the upper antherium in *Urochloa* and related genera (Poaceae, Panicoideae, Paniceae): its systematic value. **Darwiniana** v.46, n.2, p.335-355, 2008.

SALLAUD, C.; MEYNARD, D.; VAN BOXTEL, J.; GAY, C.; BÈS, M.; BRIZARD, J. P.; LARMANDE, P.; ORTEGA, D.; RAYNAL, M.; PORTEFAIX, M.; OUWERKERK, P. B. F.; RUEB, S.; DELSENY, M.; GUIDERDONI, E. Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. **Theor. Appl. Genet.**, v.106, n.8, p.1396-1408, 2003.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York, 2001

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

SAVIDAN, Y. H. Embryological analysis of facultative apomixis in *Panicum maximum* Jacq. **Crop Sci.**, v.22, p.467-469, 1982.

SCHIEFTHALER, U.; BALASUBRAMANIAN, S.; SIEBER, P.; CHEVALIER, D.; WISMAN, E.; SCHNEITZ, K. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.1164-11669, 1999.

SCHNEITZ, K.; BAKER, S. C.; GASSER, C. S.; REDWEIK, A. Pattern formation and growth during floral organogenesis: *HUELLENLOS* and *AINTEGUMENTA* are required for the formation of the proximal region of the ovule primordium in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v.125, n.14, p.2555-2563, 1998.

SHEN, X.; VALENCIA, C. A.; SZOSTAK, J. W.; DONG, B.; LIU, R. Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.102, n.17, April 26, 2005, p.5969-5974, 2005.

SHI, D.-Q.; LIU, J.; XIANG, Y.-H.; YE, D.; SUNDARESAN, V.; YANG, W.-C. *SLOW WALKER1*, essential for gametogenesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis. **Plant Cell**, v.17, n.8, p.2340-2354, 2005.

SHI, D.-Q.; YANG, W.-C. Ovule development in *Arabidopsis*: progress and challenge. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.14, n.1, p.74-80, 2011.

SHIMAMOTO, K.; KYOZUKA, J. Rice as a model for comparative genomics of plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.53, n.1, p.399-419, 2002.

SHIRASUNA, R. T. *Urochloa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.

SILVEIRA, E.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARAES, L.; DA SILVA, F.; CARNEIRO, V. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. **BMC Plant Biol.**, v.9, n.1, p.84, 2009.

SILVEIRA, E.; GUIMARÃES, L.; DE ALENCAR DUSI, D.; DA SILVA, F.; MARTINS, N.; DO CARMO COSTA, M.; ALVES-FERREIRA, M.; DE CAMPOS CARNEIRO, V. Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. **Plant Cell Rep.**, v.31, n.2, p.403-416, 2012.

SILVEIRA, E. D. **Identificação de genes relacionados ao desenvolvimento reprodutivo apomítico e sexual em *Brachiaria brizantha***. (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. 134 p.

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. **J. Plant Biotech.**, v.5, n.2, p.87-93, 2003.

SINGH, M.; BURSON, B.; FINLAYSON, S. Isolation of candidate genes for apomictic development in buffelgrass (*Pennisetum ciliare*). **Plant Mol. Biol.**, v.64, n.6, p.673-682, 2007.

SKINNER, D. J.; BAKER, S. C.; MEISTER, R. J.; BROADHVEST, J.; SCHNEITZ, K.; GASSER, C. S. The *Arabidopsis* *HUELLENLOS* gene, which is essential for normal ovule development, encodes a mitochondrial ribosomal protein. **Plant Cell**, v.13, n.12, p.2719-2730, 2001.

SOARES, A. A. C., V.M.O.; SOARES, P.C.; SANTOS, P.G.; REIS, M.S. Primavera: Cultivar de arroz com grãos agulhinha para cultivo em terras altas. **Revista Ceres** v.48, n.277, p.381-388, 2001.

SPILLANE, C.; CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis technology development - virgin births in farmers' fields? **Nat. Biotech.**, v.22, n.6, p.687-691, 2004.

STEIN, J.; QUARIN, C. L.; MARTÍNEZ, E. J.; PESSINO, S. C.; ORTIZ, J. P. A. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. **Theor. Appl. Genet.**, v.109, n.1, p.186-191, 2004.

SWAPNA, L.; KHURANA, R.; VIJAYA KUMAR, S.; TYAGI, A.; RAO, K. Pollen-specific expression of *Oryza sativa* indica pollen allergen gene (*OSIPA*) promoter in rice and *Arabidopsis* transgenic systems **Mol. Biotech.**, v.48, n.1, p.49-59, 2011.

THILMONY, R.; GUTTMAN, M.; CHINIQUY, D.; BLECHL, A. pGPro1, a novel binary vector for monocot promoter characterization. **Plant Mol. Biol. Report.**, v.24, n.1, p.57-69, 2006.

THILMONY, R.; GUTTMAN, M.; THOMSON, J. G.; BLECHL, A. E. The LP2 leucine-rich repeat receptor kinase gene promoter directs organ-specific, light-responsive expression in transgenic rice. **Plant Biotech. J.**, v.7, n.9, p.867-882, 2009.

TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. **PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis**. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology, IcoBiCoBi. Ribeirão Preto, 2003. p.

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

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; CANÇADO, L. J. **O papel da biotecnologia de forrageiras para a produção animal**. Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 41. Campo Grande, 2004b. p.



- VALLE, C. B. D. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias. In: V. T. E. A. Paulino (Ed.). **Encontro para discussão sobre espécies do gênero *Brachiaria***. Nova Odessa, v.2, 1991. Avaliação de germoplasma e melhoramento genético de braquiárias, p.301-342
- VALLE, C. B. D.; MILES, J. W. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*. In: A. M. Peixoto, J. C. d. Moura and V. P. d. Faria (Ed.). **XI Simpósio sobre manejo de pastagem**. Piracicaba, SP, Brasil.: FEALQ, v.23, 1994. Melhoramento de gramíneas do gênero *Brachiaria*, p.1
- VALLE, C. B. D.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: J. W. Miles, B. L. Maass and C. B. d. Valle (Ed.). ***Brachiaria: Biology, agronomy and improvement***. Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA, 1996. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*, p.288
- VAN WENT, J. L.; WILLEMSE, M. T. M. Fertilization. In: B. M. Johri (Ed.). **Embryology of Angiosperms**: Springer Verlag, 1984. Fertilization, p.274
- VERDAGUER, B.; KOCHKO, A.; BEACHY, R., N.; FAUQUET, C. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. **Plant Mol. Biol.**, v.V31, n.6, p.1129-1139, 1996.
- WARNER, J. R.; MCINTOSH, K. B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? **Mol. Cell**, v.34, n.1, p.3-11, 2009.
- WEIJERS, D.; FRANKE-VAN DIJK, M.; VENCKEN, R.-J.; QUINT, A.; HOOYKAAS, P.; OFFRINGA, R. An *Arabidopsis* Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a ribosomal protein S5 gene. **Development**, v.128, n.21, p.4289-4299, 2001.
- WHITTLE, C.; MALIK, M.; LI, R.; KROCHKO, J. Comparative transcript analyses of the ovule, microspore, and mature pollen in *Brassica napus*. **Plant Mol. Biol.**, v.72, n.3, p.279-299, 2009a.
- WHITTLE, C. A.; KROCHKO, J. E. Transcript profiling provides evidence of functional divergence and expression networks among ribosomal protein gene paralogs in *Brassica napus*. **Plant Cell**, v.21, n.8, p.2203-2219, 2009b.
- WOOL, I. G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v.21, n.5, p.164-165, 1996.
- YANG, W.-C.; YE, D.; XU, J.; SUNDARESAN, V. The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. **Genes Dev.**, v.13, n.16, p.2108-2117, 1999.
- YONG-QIANG, A.; MCDOWELL, J. M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E. C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R. B. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **Plant J.**, v.10, n.1, p.107-121, 1996.

YU, H.-J.; HOGAN, P.; SUNDARESAN, V. Analysis of the female gametophyte transcriptome of *Arabidopsis* by comparative expression profiling. **Plant Physiol.**, v.139, n.4, p.1853-1869, 2005.

YU, X.; WARNER, J. R. Expression of a Micro-protein. **J. Biol. Chem.**, v.276, n.36, p.33821-33825, 2001.

ZHANG, L.; LU, Y.-T. Calmodulin-binding protein kinases in plants. **Trends Plant Sci.**, v.8, n.3, p.123-127, 2003.

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

TAIR website - <http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>

