



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Caracterização de genes relacionados a fitormônios no desenvolvimento de ovários de plantas de reprodução sexual e apomítica de *Brachiaria brizantha*.

Doutoranda: **Luciana Gomes Ferreira**
Orientadora: **Dr^a Vera Tavares de Campos Carneiro**

Brasília-DF
2017



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Caracterização de genes relacionados a fitormônios no desenvolvimento de
ovários de plantas de reprodução sexual e apomítica de *Brachiaria*
brizantha.

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia Molecular
da Universidade de Brasília - UnB,
como requisito para a obtenção
do título de doutor, sob orientação da
Profa. Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro.

LUCIANA GOMES FERREIRA

Brasília

2017

Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e no Laboratório de Desenvolvimento de Plantas no Departamento de Biologia da *Università degli Studi di Milano*, Milão, Itália.

Orientadora: Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli (CENA - USP) – Examinadora externa

Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams (UnB) – Examinador interno

Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão (Embrapa, Cenargen; UnB) – Examinador externo

Profa. Dra. Vera Tavares de Campos Carneiro – Orientadora (Embrapa, Cenargen)

Membro Suplente:

Profa. Dra. Diva Maria de Alencar Dusi (Embrapa, Cenargen) – Examinador interno

Dedico esse trabalho à minha família, em especial à minha querida mãe Lúcia, à minha irmã Lara Cristine e ao meu marido Mateus, por simbolizarem o que realmente importa na vida. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, da Universidade de Brasília (UnB), que tão bem me acolheu nessa longa jornada de realização do doutorado, em nome da Profa. Dra. Sônia Freitas. Agradeço também as servidoras, Ana e Luciana, pela presteza, auxílios e pelo apoio à distância.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e da bolsa para a realização do estágio sanduíche na Universidade de Milão, na Itália.

Agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) pelas condições necessárias para poder executar o trabalho.

Agradeço à minha orientadora Dra. Vera Carneiro por acreditar em mim e aceitar me orientar, mesmo sem me conhecer. Por confiar no meu trabalho, me proporcionando condições e não medindo esforços para que eu pudesse seguir em frente na realização deste trabalho. Agradeço pelos preciosos ensinamentos, pela paciência e pelo apoio de sempre.

Agradeço à Dra. Diva Dusi pela co-orientação durante o doutorado, pelos preciosos ensinamentos em hibridização *in situ*, microscopia, e correções na tese e no artigo. Também agradeço pelo apoio, incentivo, pela alegria e tranquilidade contagiantes.

Agradeço aos membros da banca, os professores: Adriana Martinelli, Francisco Aragão, Thomas Williams e Diva Dusi, por terem se disponibilizado prontamente a fazerem a leitura e avaliação desse trabalho. Reitero meus agradecimentos aos professores Thomas Williams, Tatsuya Nagata e Diva Dusi, pela participação também na banca de qualificação, em outubro de 2015.

Agradeço à Ana Cristina Gomes pela ajuda na microscopia, em todo o processo de preparação, fixação e corte das amostras de ovários de *B. brizantha*. Também agradeço pela amizade, apoio, conversas e cafés.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Reprodução Vegetal: Aos pesquisadores Dr. Júlio Rodrigues e Dr. André Irsigler, pelos auxílios nas análises de *Southern blot* e RT-qPCR. À Dra. Gláucia Cabral pelo apoio, carinho, alegria e boas conversas. Aos colegas Camilla, Laryssa e Paulo pelo companherismo, conversas, chocolates e apoio nos momentos difíceis. À Lilian Florentino agradeço pelo apoio no laboratório durante o doutorado e pelos ensinamentos com *Arabidopsis thaliana*, pela amizade, conversas, cafés e pela visita em Milão. Às eternas apomíticas, Larissa Guimarães e Ana Luiza Lacerda, pelos ensinamentos, auxílios e por serem minha inspiração durante o meu doutorado.

Agradeço aos pesquisadores Dr. Roberto Togawa e Dra. Priscila Grynberg pela ajuda nas análises de bioinformática e a Joseane Padilha pelos auxílios nas análises estatísticas.

Aproveito para agradecer à Universidade de Milão e ao laboratório *Plant Development*, e a Dra. Lucia Colombo, por ter me orientado durante a realização do doutorado sanduíche no período de um ano. Agradeço por toda gentileza, cordialidade, respeito e orientações.

Agradeço à Marta Mendes por ter me recebido e apresentado o laboratório e ter me ensinado algumas das técnicas que utilizei para a realização deste trabalho. Também agradeço pela ajuda, dicas e conversas em português. Também gostaria de agradecer à Simona Masieiro e à Mara Cucinotta pelas orientações, auxílios, dicas, alegria e cordialidade.

Agradeço aos meus colegas italianos que fizeram eu me sentir em casa, os quais me lembro sempre com muitas saudades: Bianca, Lisa, Giulia, Carlota, Fabíola, Rosana, Manuela e Andrea pela ajuda em encontrar as coisas no laboratório, amizade, almoços, fofocas e muitos e muitos cafés. Ao amigo Davide, agradeço pelas conversas realizadas em três idiomas, risos, companhia e amizade. Stefano, por ser uma pessoa que inspira alegria, pela ajuda na identificação das CMMs, companhia, conversas e amizade. Enfim, agradeço a toda à equipe da Dra. Lucia Colombo por terem contribuído para a realização de uma etapa muito rica, proveitosa, importante e que me lembrarei para sempre.

Por fim, agradeço e reitero meu carinho e admiração às pessoas que realmente estiveram ao meu lado nesse processo: minha família. Muito obrigada a todos que sempre torceram e se preocuparam comigo e que conviveram com minha ausência durante este período.

Agradeço à minha mãe, Lúcia, por todo empenho, educação e dedicação em minha formação pessoal, e por tudo que significa em minha vida. Por entender a minha ausência durante o doutorado, principalmente no doutorado sanduíche em que ficamos um longo ano sem nos vermos, no entanto, sua coragem e amor estavam sempre comigo.

Agradeço também à minha irmã Lara Cristine e ao meu cunhado Caio, presentes que Deus me deu, amigos e companheiros em todos os momentos. Agradeço por me apoiarem sempre, me motivando com amizade, alegria e amor.

Agradeço aos amigos biólogos da Sociedade do Anel, Welinton, Anamaria, Sejana, Mateus e Ohana, por me mostrarem o verdadeiro valor da amizade e que não importa a distância ou o tempo, sempre iremos torcer e acompanhar o crescimento uns dos outros.

Agradeço ao meu melhor amigo, companheiro e marido, Mateus, por sempre ter me apoiado e incentivado, por acreditar nos meus sonhos e me ajudar a voar. Agradeço por ter transformado Milão e Brasília em duas cidades vizinhas e por não medir esforços para me auxiliar no que fosse necessário durante todo o doutorado.

Por fim agradeço a Deus (ou a energia maior que nos move), por sempre direcionar meus caminhos e me dar força e coragem, seja nos momentos difíceis ou de alegrias.

RESUMO

Brachiaria brizantha, forrageira da família *Poaceae*, possui plantas de reprodução sexual ou assexual por apomixia. As principais diferenças no desenvolvimento reprodutivo dessas plantas ocorrem nos ovários, levando à formação de sacos embrionários (SE) do tipo *Polygonum* em plantas sexuais e *Panicum* em apomíticas. Em plantas sexuais, fitormônios estão relacionados com o controle da iniciação dos primórdios e número de óvulos, e com a formação dos tegumentos, no entanto, não há estudos sobre seu papel na diferenciação dos SE das plantas apomíticas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão de genes associados a fitormônios disponíveis em bibliotecas de RNA-Seq de ovários em megasporogênese e megagametogênese de *B. brizantha*, com o desenvolvimento de SE característico das plantas sexuais e apomíticas. A análise destas bibliotecas revelou genes diferencialmente expressos nos modos de reprodução sexual e apomítico, e associados com fitormônios. Entre eles foram estudados: *BbrizGID1*, 92% similar ao gene receptor de giberelina *GID1 (Gibberellin Insensitive Dwarf1)*, *BbrizIPT9*, 90% similar ao gene *IPT9 (isopentenyltransferase 9)*, relacionado com a biossíntese de citocinina e *BbrizLOG*, 100% similar ao gene *LOG (LONELY GUY)*, associado com a ativação da citocinina. Foi detectada a presença destes genes nos genótipos de *B. brizantha* sexual e apomítico. Os genes em estudo apresentaram expressão diferenciada durante o desenvolvimento dos SE. *BbrizGID1* teve maior expressão no início da megasporogênese de plantas sexuais e apomíticas, *BbrizIPT9* em megasporogênese e megagametogênese de plantas sexuais e *BbrizLOG* nos estádios finais da megasporogênese e início da megagametogênese em plantas apomíticas. Os transcritos de *BbrizGID1* foram detectados na célula mãe do megásporo (CMM) de *B. brizantha* sexual e apomítica. Somente nas plantas apomíticas, a expressão foi também observada nas células nucleares, região na qual as células iniciais apospóricas se diferenciam para formar o SE de plantas apomíticas. *BbrizIPT9* apresentou forte expressão na CMM, tanto de plantas apomíticas como de sexuais. Os transcritos de *BbrizLOG* foram detectados na CMM e fortemente na célula inicial apospórica, célula que formará o SE do tipo *Panicum* em plantas apomíticas. A expressão dos genes *AtGID1a* e *AtGID1b* de *Arabidopsis thaliana* foi localizada nos tegumentos interno e externo dos óvulos desta planta modelo, sem expressão na CMM e nas células nucleares. A superexpressão ectópica de *AtGID1a* sob controle dos promotores p35S e pSTK, assim como a ausência de expressão de *AtIPT9* em mutante de *A. thaliana* ocasionaram a diferenciação de células semelhantes à CMM na região nucelar, sugerindo a associação destes genes com o desenvolvimento do óvulo e SE. Das células semelhantes à CMM, detectadas em plantas superexpressando *AtGID1a*, apenas uma célula por óvulo mostrou identidade de CMM, tampouco foram observados duplos SE em óvulos maduros, sugerindo que apenas uma CMM entrou no processo de gametogênese. Nosso estudo demonstrou que *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* atuam nos estádios iniciais do desenvolvimento dos SE de plantas apomíticas e sexuais e contribui para a compreensão do controle genético da apomixia.

Palavras-chave: apomixia, *Brachiaria brizantha*, fitormônios, desenvolvimento do óvulo, reprodução de plantas.

ABSTRACT

Brachiaria brizantha, forage of the Poaceae family, has plants of sexual or asexual reproduction by apomixis. The main differences in the reproductive development of these plants occur in the ovaries, leading to the formation of embryo sacs (ES) of the Polygonum-type in sexual plants and of the Panicum-type in apomicts. In sexual plants, plant hormones are related to the control of primordia initiation and number of ovules, and in the formation of the integuments, however, there are no studies on their role in the ES differentiation of apomictic plants. The aim of this work was to characterize the expression of genes associated with plant hormones from RNA-Seq libraries of ovaries at megasporogenesis and megagametogenesis stages of *B. brizantha*, with the typical ES development of sexual and apomictic plants. Analysis of these RNA-Seq libraries showed genes differentially expressed in the two reproductive modes and associated with the plant hormones. Among them were studied: *BbrizGID1*, 92% similar to the gibberellin receptor GID1 gene (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1), *BbrizIPT9*, 90% similar to the IPT9 (ISOPENTENYLTRANSFERASE 9), related to the cytokinin biosynthesis and *BbrizLOG*, 100% similar to the LOG (LONELY GUY), associated with the cytokinin activation. These genes were detected in sexual and apomictic genotypes of *B. brizantha*. They showed differential expression at different stages of ES development. *BbrizGID1* displayed higher expression in the ovaries at early megasporogenesis of sexual and apomictic plants, *BbrizIPT9* in megasporogenesis and megagametogenesis of sexual plants and *BbrizLOG* in the latter megasporogenesis and early megagametogenesis of apomictic plants. *BbrizGID1* transcripts were detected in the megaspore mother cell (MMC) of sexual and apomictic *B. brizantha*. Only in the apomictic plants, expression was also observed in the surrounding nucellar cells, a region in which aposporous initial cells differentiate to form the ES of apomictic plants. *BbrizIPT9* showed strong expression in MMC of both apomictic and sexual plants. *BbrizLOG* transcripts were detected in the MMC and strongly in the aposporous initial cells, cell which will form the ES of Panicum-type of apomictic plants. The expression of the *AtGID1a* and *AtGID1b* genes of *Arabidopsis thaliana* was localized in the inner and outer integuments of the ovules of this model plant, with no expression in the MMC and nucellar cells. *AtGID1a* ectopic overexpression under the control of the p35S and pSTK promoters, and also the absence of *AtIPT9* expression in *A. thaliana* mutant showed the formation of MMC-like cells in the nucellus, suggesting the association of these genes with the ovule and ES development. In plants overexpressing *AtGID1a*, only one MMC-like cell per ovule showed MMC identity, nor more than one ES were observed in mature ovules, suggesting that only one MMC entered the gametogenesis process. Our study demonstrated that *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* and *BbrizLOG* act in the early stages of ES development of apomictic and sexual plants and contributes to the understanding of the genetic control of apomixis.

Key words: apomixis, *Brachiaria brizantha*, plant hormones, ovule development, plant reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Brachiaria brizantha*. A - Campo experimental da Embrapa Cenargen. B - Inflorescência de *B. brizantha* em antese. C - Detalhe do racemo mostrando as espiguetas antes e depois da antese. 18

Figura 2. Esquema simplificado da reprodução sexual e apomítica (apospórica), que ocorre em *Brachiaria brizantha*, mostrando que o saco embrionário do tipo *Polygonum*, típico de plantas com reprodução sexual, com oito núcleos, se desenvolve a partir de um megásporo funcional, após degeneração de três megásporos, e pela fecundação da oosfera garante a variabilidade genética da progênie. Já na reprodução apomítica uma célula nucelar se desenvolve para a formação do saco embrionário do tipo *Panicum*, com quatro núcleos, sendo a fertilização necessária somente para o desenvolvimento do endosperma (pseudogamia), e a progênie é idêntica à planta-mãe (Baseado em CARNEIRO; DUSI, 2002)..... 20

Figura 3. *Arabidopsis thaliana*. A - Plântulas de *A. thaliana* após 30 dias de germinação em meio MS (*Murashige e Skoog Basal Medium*). B – Planta em fase vegetativa e início da fase reprodutiva mostrando as primeiras inflorescências. C - Detalhe da inflorescência mostrando os botões florais em diversos estádios do desenvolvimento floral. D - Sementes maduras e E - Detalhe dos pistilos emasculados utilizados para fecundação cruzada, barra = 1mm. 26

Figura 4. Esquema ilustrando as principais etapas da megasporogênese em *Arabidopsis thaliana*. Estádios sequenciais da megasporogênese (2-I (*finger-like*), 2-III, 2-IV e 2-V). A célula mãe do megásporo (CMM) se forma a partir de uma célula subepidérmica na extremidade distal do primórdio do óvulo. A CMM sofre meiose e forma quatro megásporos, três destes degeneram e o megásporo mais próximo à região chalazal sobrevive e se desenvolve no megásporo funcional, e irá passar para a fase de megagametogênese. Abreviações: md = megásporos em degeneração; mf = megásporo funcional; ti = tegumento interno; te = tegumento externo. Baseado em DREWS; KOLTUNOW (2011). 27

Figura 5. Esquema representando a atuação do receptor de giberelina (GID1) e sua ação integrada com a giberelina e as proteínas DELLA. Na presença de giberelina (GA), o receptor GID1 se liga ao fitormônio formando um complexo GID1-GA, que sofre uma alteração conformacional que proporciona a interação com a proteína DELLA, resultando na poliubiquitinação da proteína DELLA via complexo SCF^{GID2/SLY1} e, posteriormente, a proteína DELLA é degradada através da via do proteassoma 26S e, como consequência, a ação da giberelina é ativada. Na ausência de GA, sua ação é reprimida pela ação proteína DELLA. Baseado em HIRANO et al., (2008). GA: giberelina; Ub, ubiquitina..... 29

Figura 6. Representação esquemática da formação dos primórdios do óvulo de *Arabidopsis thaliana*. A – Flor emasculada, em que foram retiradas as pétalas, sépalas e estames. B - Detalhe da parte interna de um pistilo, setas indicam os primórdios dos óvulos em desenvolvimento na placenta. C - Modelo ilustrando a ação integrada de dois fitormônios, citocinina (CK) e auxina (transportador PIN1), para a formação do primórdio do óvulo. Baseado em Cucinotta et al., 2014..... 33

Figura 7. Resumo esquemático do metabolismo de citocinina e etapas centrais da via de sinalização da citocinina. Em *Arabidopsis thaliana*, as citocininas de tipo iP e tZ são sintetizadas pela *adenosina fosfato isopenteniltransferases* (ATP/ADP IPTs), enquanto as citocininas do tipo cZ são sintetizadas pelas tRNA IPTs. iPRTP, iPRDP, tZRTP e tZRDP são desfosforilados por fosfatases e iPRMP e tZRMP podem ser diretamente convertido em bases livres ativas pelo *cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase* (LOGs). Baseado em Werner & Schmulling, (2009)..... 36

Figura 8. Esquema do vetor pGEM® -T Easy Vector Systems (Promega) utilizado para clonagem das seqüências gênicas utilizadas para o preparo das sondas de hibridização in situ, contendo os sítios de iniciação da RNA polimerase T7 e SP6, e sítios de enzimas utilizadas para linearização do plasmídeo. 45

Figura 9. Esquema dos vetores contendo o promotor constitutivo 35S (A) e do vetor contendo o promotor SEEDSTICK que possui expressão específica no óvulo (B), utilizados como vetores de destino para a superexpressão de *AtGID1a*, com as construções *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a*, respectivamente. 55

Figura 10. Seleção de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. A - Plantas de *A. thaliana* em vasos sem agentes seletivos e B - plantas transformadas com a construção *pSTK::AtGID1a* em vasos contendo o agente seletivo fosfinotricina (PPT) aplicado diretamente no solo apresentando uma planta resistente (seta). C - Plantas transformadas com a construção *p35S::AtGID1a* selecionadas em placa de Petri contendo canamicina 100 µg/L. 56

Figura 11. Comparação das seqüências previstas de aminoácidos de *BbrizGID1* de plantas apomíticas (APO) e sexuais (SEX). Na posição 12, uma lisina (K) encontrada em plantas sexuais é substituída por uma treonina (T) em plantas apomíticas. Na posição 152, uma isoleucina (I) encontrada em plantas sexuais é substituída por uma valina (V) em plantas apomíticas. Na posição 217, uma lisina (K) de sexuais é substituída por uma arginina (R) em apomíticos (setas). O programa ClustalW foi usado para o alinhamento. 60

Figura 12. Alinhamento múltiplo da seqüência de *BbrizGID1* e as seqüências mais similares encontradas no banco de dados NCBI: *Setaria italica* (Número de acesso XP_004962116.1), *Sorghum Bicolor* (CAP64329.1), *Saccharum officinarum* (CAP64326.1), *Zea mays* (CAP64327.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003568469.1), *Oryza sativa japonica group* (XP_015639961.1), *Hordeum vulgare* (CAO98733.1), *AtGID1a* (At3g05120), *AtGID1b* (At3g63010) e *AtGID1c* (At5g27320). Resíduos de aminoácidos idênticos são marcados em cinza. Os quadrados identificam os motivos HGG e GX SXG, regiões conservadas com a família homônio sensitive lipase (HSL). As setas pretas mostram os três centros catalíticos, serina (S), ácido aspártico (D) e isoleucina (I), este último substitui a histidina (H), característica da família HSL. As setas brancas indicam dois resíduos de aminoácidos conservados, glicina (G) e arginina (R), que são essenciais para manter a atividade de ligação do receptor a giberelina em arroz (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005). O programa ClustalW foi usado para o alinhamento múltiplo. 62

Figura 13. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de *BbrizGID1* de plantas apomíticas e a seqüência consenso da família hormônio sensitive lipase (HSL). Os quadrados representam motivos HSL conservados, HGG e GX SXG. As setas pretas mostram os três centros catalíticos, serina (S), ácido aspártico (D) e histidina (H) da HSL, enquanto o terceiro aminoácido foi substituído por isoleucina (I) nas plantas de *Brachiaria brizantha*. O programa ClustalW foi usado para o alinhamento das seqüências. 63

Figura 14. Comparação das seqüências previstas de aminoácidos de *BbrizIPT9* de plantas apomíticas (APO) e sexuais (SEX). A seqüência dos genes obtidos no banco de dados genômicos não mostrou diferença entre nucleotídeos e aminoácidos, apresentando uma seqüência idêntica entre os genótipos de plantas apomíticas e sexuais. O programa ClustalW foi usado para o alinhamento. 64

Figura 15. Alinhamento múltiplo de *BbrizIPT9* e as seqüências similares encontradas no banco de dados NCBI: *Setaria italica* (XP_004963310.1), *Sorghum bicolor* (XP_002463348.1), *Zea mays*

(AQK80671.1), *Saccharum* hybrid cultivar R570 (AGT16524.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003563223.2), *Oryza sativa* japonica group (XP_015644187.1), *Oryza brachyantha* (XP_006656524.1), *Aegilops tauschii* (XP_020163508.1) e *Hordeum vulgare* (BAJ89736.1). Resíduos de aminoácidos idênticos são marcados em cinza. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o programa ClustalW. 65

Figura 16. Comparação das sequências preditas de aminoácidos de *BbrizLOG* de plantas apomíticas (APO) e sexuais (SEX). A sequência dos genes obtidos no banco de dados genômicos não mostrou diferença entre os 206 aminoácidos entre os genótipos de plantas apomíticas e sexuais. O programa ClustalW foi usado para o alinhamento. 66

Figura 17. Alinhamento múltiplo das sequências de *BbrizLOG* com as sequências mais semelhantes encontradas no banco de dados NCBI e no banco de dados TAIR: *Setaria italica* (Número de acesso XP_004982851.1), *Dichantherium oligosanthes* (OEL17164.1), *Panicum hallii* (PAN46850.1), *Sorghum Bicolor* (XP_002467072.1), *Oryza sativa* japonica group (XP_015613334.1), *Zea mays* (NP_001169307.1), *Oryza brachyantha* (XP_006661863.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003574067), *AtLOG4* (AT3G53450) e *AtLOG1* (AT2G28305). Resíduos de aminoácidos idênticos são marcados em cinza. Os quadrados indicam um motivo altamente conservado PGGXGTXXE entre as sequências. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o ClustalW. 67

Figura 18. Análise do DNA genômico de *Brachiaria brizantha* apomítica (APO) e sexual (SEX) digerida com *EcoRI* (E); *HindIII* (H) e *XbaI* (X). Eletroforese em gel de agarose 0,8% (A, C e E) e fragmentos hibridizados por *Southern blot* de *BbrizGID1* (B), *BbrizIPT9* (D) e *BbrizLOG* (F), marcados com a sonda radioativa marcada com ³²P. A imagem foi gerada usando o *phosphor imaging plate*. C = controle, mesmo fragmento usado para sintetizar a sonda. 69

Figura 19. Perfil de expressão relativa de *BbrizGID1* (A e B), *BbrizIPT9* (C e D), e *BbrizLOG* (E e F). Análise de dados da biblioteca de RNA-seq (A, C e D) mostrando o perfil de expressão em ovários de plantas apomíticas (■) e de plantas sexuais (□) nos estádios de megasporogênese (I +II) e megagametogênese (III + IV) e análise da expressão obtida por RT-qPCR (B, D e F) nos mesmos estádios de desenvolvimento do ovário, megasporogênese (I +II) e megagametogênese (III + IV). Barras representam o desvio padrão com base na média de três amostras biológicas. 71

Figura 20. Boxplot mostrando a expressão relativa de *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* por RT-qPCR. Análise da expressão em ovários nas diferentes fases do desenvolvimento, antes da antese (I, II, III e IV), de plantas apomíticas (■) e de plantas sexuais (□). Barras representam o desvio padrão com base na média de três réplicas biológicas. Os quartis médios, mediana e ANODEV foram calculados no programa R Core Team (2016). A diferença significativa foi observada entre os modos de reprodução, apomítica e sexual, e entre os estádios de desenvolvimento do ovário (p <0,05). 73

Figura 21. Localização da expressão de *BbrizGID1* por hibridização in situ em seções semi-finas de ovários e anteras de plantas sexuais (A – D) e apomíticas (E – H) de *Brachiaria brizantha*. A - Ovário mostrando preservação do RNA total (laranja), seta indicando a CMM em controle com laranja de acridina. B - Visão geral do ovário apresentando forte sinal de hibridização na CMM (seta) e anteras mostrando forte sinal de hibridização nas células mãe do micrósporo (cabeça de seta). C - Detalhe do óvulo com forte marcação na CMM (seta) e apresentando sinal mais fraco nas células nucleares (nu), e nos tegumentos interno (ti) e externo (te). D - Controle hibridizado com a sonda senso sem sinal. E - Visão geral do ovário de plantas apomíticas apresentando forte marcação na CMM (seta) e anteras com forte sinal de hibridização nas células mãe do micrósporo (cabeça de seta). F - Detalhe do óvulo

com forte sinal de hibridização na CMM (seta) e nas células nucelares (nu), e apresentando sinal fraco nos tegumentos interno (ti) e externo (te). G - Secção seguinte do óvulo anterior (F) mostrando o citoplasma da CMM fortemente hibridizado (seta). H - Ovário hibridizado com a sonda senso (controle) e não apresentando sinal. CMM = célula mãe do megásporo; Barras: A = 10 µm, B = 50 µm, C = 12 µm, D = 20 µm, E = 100 µm e F – H = 10 µm. 75

Figura 22. Localização da expressão de *BbrizIPT9* por hibridização in situ em ovários e anteras de plantas apomíticas (A – D) e sexuais (E – H) de *Brachiaria brizantha*. A - Ovário mostrando pouca marcação na célula arqueosporica (seta fina) e forte hibridização na porção superior do estilete (seta larga). B - Detalhe do ovário apresentando sinal de hibridização na CMM (seta). C - Ovário hibridizado com a sonda controle senso. D - Antera com hibridização nas células mãe do micrósporo (setas). E - Ovário de planta sexual com forte sinal de hibridização na CMM e nas células nucelares próximas (seta). F - Detalhe do óvulo apresentando forte marcação na CMM (seta) e com pouco sinal de hibridização nos tegumentos (te). G - Lodículas de planta sexual com forte hibridização (setas). H - Antera de planta sexual com hibridização nas células mãe do micrósporo (setas). CMM = célula mãe do megásporo. Barras: A – B = 10 µm; C – D = 20 µm; E – F = 10 µm ; G – H = 25 µm. 77

Figura 23. Hibridização in situ de *BbrizLOG* em ovários e anteras de plantas apomíticas (A – C, I) e sexuais (D – H) de *Brachiaria brizantha* nos estádios de megasporogênese e megagametogênese. A - Ovário hibridizado com a sonda controle senso sem sinal, seta indicando a CMM. B – C Ovários apresentando sinal de hibridização na CMM (seta larga) e forte expressão na célula inicial apósporica (seta fina). D - Ovário de planta sexual hibridizado com a sonda controle senso, seta mostrando a CMM. E - Ovário evidenciando forte expressão no citoplasma da CMM (seta larga). F - Detalhe do óvulo mostrando o núcleo da CMM fortemente hibridizado (seta fina) e células nucelares (seta larga). G - Saco embrionário maduro (seta) de planta sexual mostrando hibridização nas células do aparato da oosfera. H - Detalhe das antípodas (seta) em que não houve sinal de hibridização. I - Anteras de plantas apomíticas com forte sinal de hibridização nos micrósporos (setas). CMM = célula mãe do megásporo; Barras: A = 5 µm; B – C = 2 µm; D – F = 25 µm; E, G – I = 10 µm. 78

Figura 24. Análise histoquímica de GUS em inflorescências e óvulos de *Arabidopsis thaliana* antes da antese, utilizando as linhagens transgênicas: A – C: *pAtGID1a::AtGID1a-GUS*; D – F: *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* e G – H: *pAtGID1::AtGID1-GUS*. A - A expressão de GUS foi observada principalmente no pedúnculo (S), nos óvulos (setas) e nas anteras (cabeças de setas). B - No estágio 2-III do desenvolvimento do óvulo, o sinal de GUS foi observado nos tegumentos interno (ti) e externo (te), e não foi detectado na CMM em meiose (seta) e nem nas células nucelares. C - Nos óvulos maduros o sinal GUS foi localizado em todo o SE e nos tegumentos. D – E No Estádio 2-III (D) e FG0 (E), o sinal GUS foi observado nos tegumentos interno (ti) e externo (te), e não foi detectado na CMM em meiose (seta) e nem nas células nucelares. F - No SE maduro, o sinal GUS foi detectado principalmente na região da calaza (Ch) em comparação com a região da micrópila (MP). G - O sinal de GUS foi localizado especificamente no septo (se), mas estava completamente ausente nos óvulos (ov) e funículos. H - O sinal GUS foi indetectável nos óvulos, setas mostram as CMMs e as células nucelares. CMM = célula mãe do megásporo; SE = saco embrionário; Barras: A = 1mm; B – F = 20 µm e G – H = 50 µm. 80

Figura 25. Análise da expressão relativa obtida por RT-qPCR utilizando inflorescências de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *AtGID1a* sob o controle do promotor constitutivo 35S (*p35S::AtGID1a*) e do promotor SEEDSTICK específico do óvulo (*pSTK::AtGID1a*). As barras representam o desvio padrão com base na média de três réplicas biológicas. *Actin8* e *Ubiquitin10* foram utilizados como genes de referência. WT: tipo selvagem (ecótipo Columbia). 81

Figura 26. Óvulos de plantas selvagens e linhagens transgênicas *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a* de *Arabidopsis thaliana* nas principais fases do desenvolvimento do óvulo. A – F = Óvulos de plantas selvagens do ecótipo Columbia durante o desenvolvimento do SE. A - Estádio *finger-like* (2-I) mostrando a CMM (seta). B – C Estádio 2-III (B) e FG1 (C) indicando o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te) e CMMs (setas). D - Estádio FG2 evidenciando os megásporos em degeneração (asteriscos) e o megásporo funcional (setas). E - FG3 apresentando megásporos degenerados e SE (seta). F - Óvulo maduro no estágio FG6, a seta indica a célula central. G – O = Linhagem transgênica *pSTK::AtGID1a*. G – H Estádio de *finger-like* (2-I), mostrando a CMM (setas) e células adicionais semelhantes à CMM (cabeças de seta). I – L Estádio 2-III mostrando o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te), CMMs (setas) e células semelhantes à CMM (cabeças de seta). M – N FG1 mostrando os megásporos em degeneração (asteriscos), megásporo funcional (setas) e tegumentos internos (ti) e externos (te) bem desenvolvidos. O - Estádio FG6, a seta indica a célula central. P – W = Linhagem transgênica *p35S::AtGID1a*. P – Q Estádio de *finger-like* (2-I), visualizando a CMM (setas) e células semelhantes à CMM (cabeças de seta). R – S Estádio 2-III mostrando a CMM (setas) e o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te). T - Representa uma tétrade (cabeça de seta) e tegumentos interno (ti) e externo (te) em desenvolvimento. U - FG1 mostrando o megásporo funcional (seta), megásporos degenerados (asteriscos) e tegumentos bem desenvolvidos. V - FG4 mostrando o SE constituído por quatro núcleos, dois núcleos no pólo micropilar e calazal (cabeças de seta). W – Estádio FG6 apresentando células antípodas (seta) e os três núcleos no pólo micropilar (cabeça de seta). CMM = célula mãe do megásporo. SE = saco embrionário; Barras: A – B = 20 µm; C = 10 µm; D – F = 20 µm; G – H = 100 µm; I = 50 µm; J – K = 25 µm; L = 100 µm, M = 5 µm; N = 100 µm; O = 10 µm; P – Q = 50 µm; R = 10 µm; S = 5 µm; T – U = 10 µm e V - W = 20 µm. 82

Figura 27. Comparação entre o número de óvulos com células adicionais semelhantes à CMM de plantas selvagens e transgênicas, *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a*, de *Arabidopsis thaliana*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre o número de células adicionais semelhantes à CMM de plantas transgênicas e de tipo selvagem, independentemente do promotor utilizado para a superexpressão de *AtGID1a*, pSTK (p = 0,009) ou p35S (p = 0,013). WT: tipo selvagem; n = número de óvulos analisados; CMM = célula mãe do megásporo. 83

Figura 28. Os óvulos de *Arabidopsis thaliana* da linhagem transgênica *pKNU::nlsYFP* superexpressando *AtGID1a* sob o controle de p35S, com a CMM marcada com a fluorescência YFP. A - Óvulos no estágio 2-III com duas células, CMM (seta) e outra célula adicional semelhantes à CMM (cabeça de seta). B - Óvulo no mesmo momento do anterior usando luz UV e mostrou sinal de fluorescência somente em uma célula, CMM (seta), e não apresentou sinal nas células adicionais semelhantes à CMM das plantas transgênicas. C - Óvulos no estágio de *finger-like* (2-I), ilustrando a fluorescência amarela nas células CMM. CMM = célula mãe do megásporo. Barras: A - C = 10 µm. 84

Figura 29. Comparação entre o número de sementes por siliqua nas plantas transgênicas *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a* em relação às plantas de tipo selvagem (WT). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre o número de sementes do tipo selvagem e as plantas transgênicas que expressam ectopicamente *AtGID1a*, independente do promotor utilizado, pSTK (p = 0,0009) ou p35S (p = 0,001). 85

Figura 30. Estrutura genômica do gene *AtIPT9* (AT5G20040.3) de *A. thaliana*. O local de inserção do T-DNA (SALK_027711) está indicado pelo triângulo na região promotora do gene (3'UTR). Os blocos pretos representam os éxons e os traços finos, os íntrons. 85

Figura 31. Análise de expressão por RT-qPCR de *AtIPT9* em plantas mutantes *ipt9* e selvagens de *Arabidopsis thaliana*. As barras representam o desvio padrão com base na média de três réplicas biológicas. *Actin8* e *Ubiquitin10* foram utilizados como o gene de referência. WT: tipo selvagem (ecótipo Columbia)..... 86

Figura 32. Óvulos de *Arabidopsis thaliana* selvagens ecótipo Columbia (A – F) e mutantes *ipt9* (G – K) nos principais estádios de desenvolvimento do óvulo. A - Estádio *finger-like* (2-I) mostrando a CMM (seta) e a célula adicional semelhante à CMM (seta fina). B – C Estádio 2-III (B) e FG1 (C) mostrando o desenvolvimento dos tegumentos internos (ti) e externos (te) e CMMs (setas). D - FG2 mostrando os megásporos em degeneração (asteriscos) e o megásporo funcional (setas). E - FG3 apresentando megásporos em degeneração (asteriscos) e o gametófito feminino em desenvolvimento (seta). F - Óvulo maduro no estágio de FG6, a seta indica a célula central. G - Estádio *finger-like* (2-I) mostrando a CMM (seta) e a célula adicional semelhante à CMM (seta fina). H - FG0 mostrando o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te) e seta mostrando a CMM. I - Óvulos nos estádios de FG1 mostrando o desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te), megásporos em degeneração (asteriscos) e diferenciação do megásporo funcional (seta). J - Estádio FG3 mostrando o saco embrionário imaturo binuclear (seta). K - Óvulo maduro FG6, seta indica o aparatato da oosfera. CMM = célula mãe do megásporo. Barras = A – B = 20 µm; C = 10 µm; D – F = 20 µm; G = 200 µm; I – K = 20 µm. 87

Figura 33. Comparação entre o número de óvulos com células adicionais semelhantes à CMM de linhagens selvagens e mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre o número de células adicionais semelhantes à CMM de plantas mutantes *ipt9* e de tipo selvagem ($p = 0,038$). WT: tipo selvagem; N = número de óvulos analisados; CMM = célula mãe do megásporo. 88

Figura 34. Comparação entre o número de sementes por síliqua nas plantas mutantes *ipt9* em relação às plantas de tipo selvagem (WT). Não houve diferença significativa entre o número de sementes por síliqua observados nos mutantes *ipt9* e nas plantas selvagens ($p = 0,58$). 88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sequências dos iniciadores utilizados para análise da expressão relativa por RT-qPCR, dos genes em estudo. 42
- Tabela 2** - Sequências dos iniciadores utilizados para a construção da sonda para hibridização in situ referentes aos genes *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG*. 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Brachiaria</i>	17
1.2 Modos de reprodução sexual e apomítica	18
1.3 Interesse no estudo da apomixia	21
1.4 Identificação de sequências específicas de ovários de <i>B. brizantha</i>	22
1.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo	25
1.6 Fitormônios e sua relação com o desenvolvimento do óvulo	27
1.6.1 Giberelinas	28
1.6.2 Auxinas	31
1.6.3 Citocininas	32
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivos específicos:	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Material vegetal	39
3.2 Coleta e extração de RNA	39
3.3 Reações de RT-qPCR	40
3.4 Hibridização in situ em ovários de <i>B. brizantha</i>	43
3.4.1 Amplificação do fragmento utilizado como sonda	43
3.4.2 Clonagem do fragmento a ser utilizado como sonda	44
3.4.3 Extração do plasmídeo por lise alcalina	45
3.4.4 Sequenciamento	46
3.4.5 Linearização dos plasmídeos	46
3.4.6 Transcrição e marcação da sonda	47
3.4.7 Preparação das lâminas para a hibridização in situ	47
3.4.8 Teste de laranja de acridina	48
3.4.9 Hibridização in situ	49
3.5 Extração de DNA genômico	50
3.6 Construção da sonda para <i>Southern blot</i>	51
3.6.1 Preparação da membrana de hibridização para <i>Southern Blot</i>	52
3.6.2 <i>Southern blot</i>	52
3.7 Análises de sequências dos genes em estudo	53

3.8	Construção de vetores e transformação de <i>A. thaliana</i>	53
3.9	Análise morfológica dos óvulos de <i>A. thaliana</i>	56
3.9.1	Microscopia Confocal de Varredura a Laser	57
3.10	Análise de expressão de GUS	57
4	RESULTADOS	59
4.1	Análise das sequências dos genes de expressão diferencial associados ao metabolismo de fitormônios	59
4.2	Detecção da presença dos genes em estudo nos genótipos de <i>B. brizantha</i> sexual e apomítico.....	68
4.3	Expressão gênica determinada em ovários em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas apomíticas e sexuais de <i>B. brizantha</i>	70
4.4	Localização da expressão in situ dos genes em estudo em ovários de <i>B. brizantha</i> apomítica e sexual	74
4.5	Determinação da localização de expressão de <i>GID1</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> e alterações fenotípicas pela superexpressão de <i>AtGID1a</i> em transgênicos	78
4.6	Análise do desenvolvimento de óvulos e sementes de plantas mutantes <i>ipt9</i> de <i>A. thaliana</i>	85
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÕES	97
7	PERSPECTIVAS	98
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
	APÊNDICES	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Brachiaria*

Brachiaria, gênero da família *Poaceae*, possui as principais espécies de forrageiras mais cultivadas e economicamente importantes no Brasil (ARAÚJO et al., 2008). Isso se deve principalmente à boa adaptação dessas forrageiras a diferentes tipos de solo, ao estresse hídrico e à tolerância a pragas, além de apresentar boa qualidade nutricional para o gado (VALLE et al., 2004). O gênero foi introduzido na América do Sul no século XVIII, e possui cerca de 100 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (RENVOIZE et al., 1996). Nestas espécies a reprodução pode ser sexual ou assexual por apomixia, com progênies que são geneticamente idênticas à planta mãe.

Algumas espécies do gênero *Brachiaria* passaram a ser consideradas como pertencentes ao gênero *Urochloa* (SHIRASUNA, 2010), no entanto, os taxonomistas e a curadoria de gramíneas forrageiras da Embrapa sugerem novos estudos para melhor entender as relações entre essas espécies e gêneros e orientam que seja mantida a denominação *Brachiaria* indicando-se a sinonímia com *Urochloa* na primeira citação (VALLE, 2010).

As principais espécies de *Brachiaria* participam com 87% das sementes comercializadas no Brasil, e as mais importantes são: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis* (KARIA et al., 2006). Todas as plantas apomíticas de *Brachiaria* caracterizadas até o momento são poliplóides, geralmente tetraplóides com $2n=4x=36$, enquanto as plantas sexuais em geral são diplóides, $2n=2x=18$ (VALLE et al., 2004). Dentro de uma mesma espécie existem plantas de ambos os modos de reprodução como em *B. decumbens* e *B. brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*), objeto deste trabalho (Figura 1). Esta característica as torna um sistema apropriado para estudos comparativos, sobretudo de determinação das vias moleculares envolvidas na reprodução.

O gênero *Brachiaria* é composto por espécies herbáceas, com inflorescências terminais do tipo panícula com dois ou até cinco racemos que sustentam as espiguetas dispostas em duas fileiras, cada espiguetas desenvolve duas flores, uma masculina e uma hermafrodita (CARNEIRO; DUSI, 2002). Análises morfológicas do desenvolvimento do ovário em plantas sexuais e apomíticas mostraram que a formação do megagametófito ou gametófito feminino ou saco embrionário (SE) e o desenvolvimento de sementes são

diferentes em plantas de modos distintos de reprodução, plantas apomíticas apresentam SE tipo *Panicum* e, plantas sexuais, tipo *Polygonum* (ARAÚJO et al., 2000).



Figura 1. *Brachiaria brizantha*. **A** - Campo experimental da Embrapa Cenargen. **B** - Inflorescência de *B. brizantha* em antese. **C** - Detalhe do racemo mostrando as espiguetas antes e depois da antese.

1.2 Modos de reprodução sexual e apomítica

Em angiospermas, o desenvolvimento do óvulo se inicia com a formação do primórdio do óvulo, uma protusão semelhante a dedos (“*finger-like*”) do tecido placentário do ovário. O desenvolvimento do SE se inicia com a diferenciação de uma célula sub-epidermal do nucelo que irá se diferenciar em célula mãe do megásporo (CMM). A CMM sofrerá meiose, formando quatro megásporos haploides. Três deles degeneram, e somente um megásporo sobrevivente irá se tornar funcional, aquele mais próximo à região chalazal. Ao mesmo tempo, células da epiderme se dividem para formar duas células primordiais, que irão formar os tegumentos interno e externo. Enquanto os megásporos não funcionais sofrem morte celular, o megásporo funcional aumenta de tamanho e passa por três divisões mitóticas e celularização resultando na formação de um SE típico de plantas com reprodução sexual, do tipo *Polygonum* com oito núcleos e sete células: três antípodas, uma célula central diploide, duas sinérgides e uma oosfera (SCHNEITZ, KAY et al., 1995; GROSSNIKLAUS; SCHNEITZ, 1998; YANG et al., 2010). Dupla fecundação ocorre no óvulo quando uma célula espermática se funde com a oosfera e outra com a célula central dando origem, respectivamente, ao zigoto diploide, precursor do embrião, e ao endosperma triploide (DUSI, 2001) (Figura 2).

A apomixia ocorre em 15% das famílias das angiospermas, 75% das famílias Poaceae, Asteraceae e Rosaceae (DALL’AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2012). Há dois tipos principais de apomixia: gametofítica e esporofítica (ASKER; JERLING, 1992). A primeira ocorre especialmente em gramíneas forrageiras como dos gêneros *Brachiaria*, *Cenchrus*,

Panicum, Paspalum, Poa. Na apomixia gametofítica há formação de um SE não reduzido por: - diplosporia, a CMM não sofre meiose, ou - aposporia, células somáticas do nucelo (NOGLER, 1984). Nos SE não reduzidos, há desenvolvimento do embrião a partir da oosfera (partenogênese). O endosperma pode desenvolver-se também autonomamente, ou seja, somente a partir dos núcleos polares (sem a polinização), ou pela união do núcleo espermático com os núcleos polares (pseudogamia). Na apomixia esporofítica, como ocorre em espécies de *Citrus* e *Mangifera*, não há formação de SE, mas os embriões diploides desenvolvem-se diretamente de células dos envoltórios do óvulo (DALL'AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2012).

A reprodução apomítica descrita para plantas de *B. brizantha* é do tipo apospórica (VALLE; MILES, 1992) (Figura 2). Neste modo de reprodução assexuado, a CMM sofre meiose para formar quatro megásporos, no entanto, todos os quatro megásporos degeneram e, ao mesmo tempo, células nucelares perto da CMM se diferenciam em células iniciais apospóricas, células que sofrerão duas mitoses para formar um coenócito com quatro núcleos posicionados no mesmo polo. Após celularização, SE não reduzido do tipo *Panicum* é formado, contendo apenas quatro células diploides: a oosfera, a célula central, e duas sinérgides (ARAUJO et al., 2000; ALVES et al., 2001).

A ausência de células antípodas e a natureza não reduzida das células são características do SE do tipo *Panicum*. Além disso, mais de uma célula inicial apospórica pode se desenvolver, e assim formar mais do que um SE. Se um megásporo chalazal sobrevive, um SE de tipo *Polygonum* pode ser encontrado sozinho ou ao lado de um SE apospórico. Em *B. brizantha* cv. Marandu, este foi encontrado em apenas 2% dos óvulos (ARAUJO et al., 2000). Enquanto os embriões se desenvolvem de forma autônoma, o núcleo polar deve ser fecundado para a formação do endosperma, apomixia pseudogâmica (ALVES et al., 2001). O desenvolvimento das anteras parece ser idêntico em plantas sexuais e apomíticas de *Brachiaria* (LUTTS et al., 1994; DUSI; WILLEMSE, 1999).

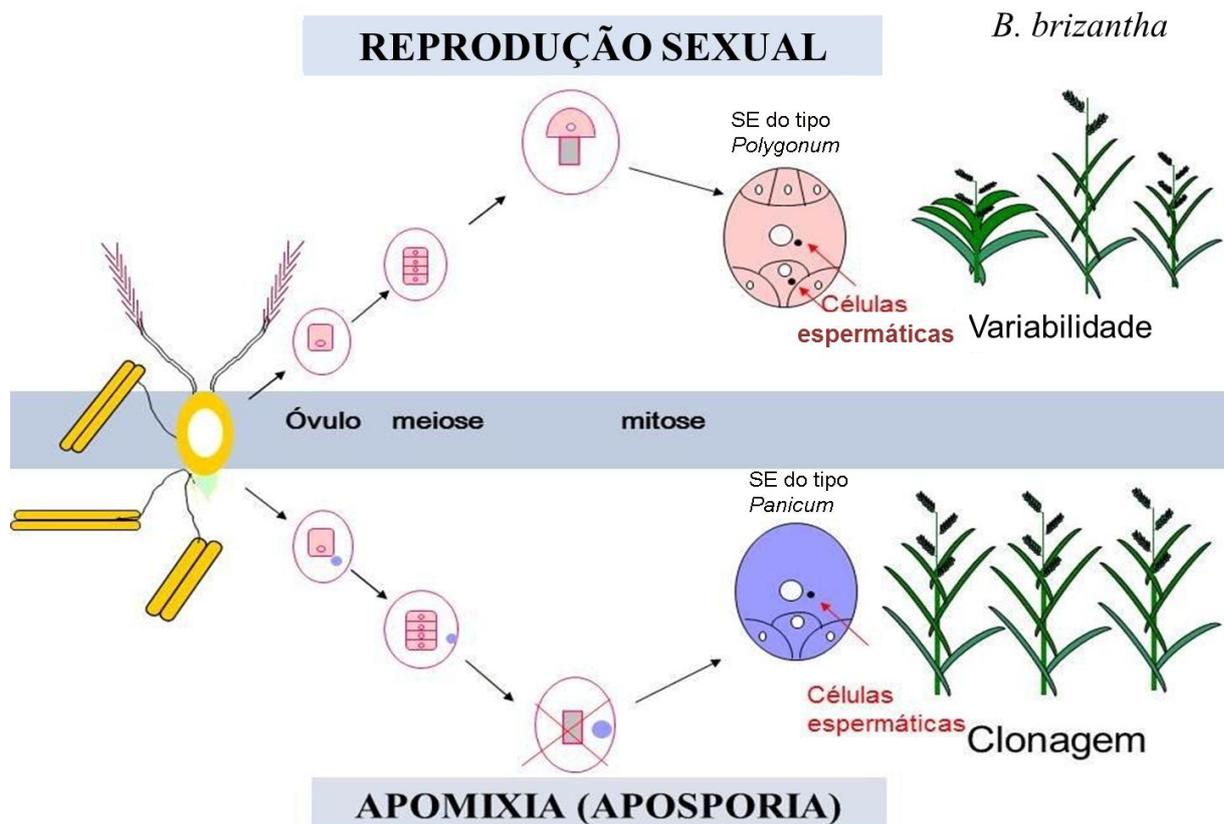


Figura 2. Esquema simplificado da reprodução sexual e apomítica (apospórica), que ocorre em *Brachiaria brizantha*, mostrando que o saco embrionário (SE) do tipo *Polygonum*, típico de plantas com reprodução sexual, com oito núcleos, se desenvolve a partir de um megásporo funcional, após degeneração de três megásporos, e pela fecundação da oosfera garante a variabilidade genética da progênie. Já na reprodução apomítica uma célula nucelar se desenvolve para a formação do saco embrionário do tipo *Panicum*, com quatro núcleos, sendo a fertilização necessária somente para o desenvolvimento do endosperma (pseudogamia), e a progênie é idêntica à planta-mãe (Baseado em CARNEIRO; DUSI, 2002).

Pistilos de *B. brizantha* foram previamente classificados em quatro diferentes estádios de desenvolvimento, baseado no comprimento e na morfologia dos estigmas (ARAÚJO, et al., 2000). Estádios I e II contêm óvulos em megasporogênese, já os estádios III e IV contêm óvulos em megagametogênese. Estádio I inclui pistilos de aproximadamente 0,48 mm de comprimento com a presença de células nucleares e CMM, nas plantas sexuais e apomíticas; estágio II, 1,38 mm de estigmas alongados, presença de AI nas plantas apomíticas e megásporos no SE mitótico; estágio III apresenta o estigma com o comprimento de 2,36 mm, presença do SE imaturo, três ou cinco SE imaturos nas plantas apomíticas e apenas um SE no início do desenvolvimento em plantas de reprodução sexual; estágio IV com pistilos de 3,63

mm de comprimento e já apresentam SE maduro, tipo *Panicum*, nas plantas apomíticas e o SE do tipo *Polygonum* nas plantas sexuais (RODRIGUES, et al., 2003).

Os acessos sexuais de *B. brizantha* são geralmente considerados pouco férteis (VALLE; SAVIDAN, 1996). Araujo et al., (2007) sugeriram que a baixa fertilidade não seja proveniente de alterações no desenvolvimento floral e na estrutura dos gametas, ou na rejeição do tubo polínico, mas muito provavelmente uma consequência de depressão por endogamia, onde ocorre o acúmulo de alelos recessivos deletérios devido ao cruzamento de indivíduos aparentados. Estes autores fizeram a caracterização morfológica do único genótipo sexual de *B. brizantha* e verificaram que a taxa de aborto foi gradualmente aumentando de dois até sete dias após a antese.

1.3 Interesse no estudo da apomixia

O modo de reprodução por apomixia é considerado um desafio na agricultura. Por um lado, seus genes reguladores poderão ser usados para fixação de genótipos de interesse e por outro, a quebra da apomixia é necessária para permitir a hibridização e melhoramento de variedades apomíticas (CARNEIRO; DUSI, 2004). A apomixia proporciona a clonagem de plantas por sementes resultando em descendência constituída por réplicas genéticas exatas do progenitor feminino, pois os embriões são derivados do desenvolvimento partenogênico de células somáticas e por isso tem importante papel como ferramenta no melhoramento. A herança da apomixia é dominante e ligada a um único locus genético em *B. brizantha* (VALLE et al., 2004), o que fundamenta a procura de genes envolvidos no processo de reprodução por apomixia.

A fixação do vigor híbrido por meio da apomixia é um objetivo desejável para agricultores e deverá ter um impacto na produção de alimentos e na agricultura. A fixação de um dado genótipo ocorre naturalmente em espécies que exibem um tipo de semente apomítica, no entanto, apesar de muitos esforços, ainda não foi possível introduzir apomixia em espécies de culturas domesticadas (BARCACCIA; ALBERTINI, 2013). A desregulação dos genes associados com a megasporogênese poderia redirecionar o caminho do desenvolvimento do gametófito alterando a sua forma de reprodução para a apomixia, uma evidência que apoia esta ideia é de que as características de formação de ovário e de embrião apomíticos foram encontradas em plantas mutantes sexuais (TUCKER et al., 2003).

Se os mecanismos da reprodução apomítica forem conhecidos, tecnologias visando seu controle poderão ser geradas. Essas sementes poderão ser produzidas por muitas gerações sem perder o vigor ou ter alteração de genótipo, o que seria importante para a redução de custos de produção, pois boa parte dos gastos iniciais de cultura referem-se à aquisição de sementes (SPILLANE et al., 2004). No melhoramento genético, a possibilidade de controle dos mecanismos de reprodução por apomixia poderá contribuir para o aumento da variabilidade genética. No entanto, o desenvolvimento da tecnologia na agricultura deverá exigir um conhecimento mais profundo dos mecanismos que regulam o desenvolvimento reprodutivo em plantas apomíticas, que será aumentada pela identificação de genes que são diferencialmente expressos especificamente ou durante a formação do SE e de embriões. Ao longo das duas últimas décadas, buscou-se o isolamento de genes nas principais etapas de controle da via apomítica para produção de plantas por engenharia genética com fenótipos parecidos com os apomíticos (BARCACCIA; ALBERTINI, 2013).

1.4 Identificação de sequências específicas de ovários de *B. brizantha*

Os principais eventos reprodutivos, como a diferenciação das células que irão constituir o SE, bem como a formação do óvulo ocorrem dentro dos ovários, por isso o estudo de genes expressos neste órgão se torna muito promissor para entender os mecanismos da reprodução. Em *B. brizantha* a identificação de genes que são diferencialmente expressos entre plantas apomíticas e sexuais, durante os estádios de desenvolvimento do óvulo, é uma excelente forma para os estudos relacionados com a apomixia.

Em *B. brizantha*, os primeiros estudos moleculares levaram à identificação de 11 genes diferencialmente expressos em ovários de plantas de reprodução apomítica e sexual, nos estádios de megasporogênese e megagametogênese, sendo seis deles provenientes de ovários de plantas apomíticas, dois de plantas sexuais e três de apomíticas e sexuais mas em diferentes estádios de desenvolvimento (RODRIGUES, et al., 2003). Entre elas, Alves, et al. (2007) reportaram o padrão de expressão espacial e temporal de três sequências com identidade molecular à miosina, aquaporina e MAP-quinase (proteínas quinases ativadas por mitógenos), chamadas de *BbrizMYO*, *BbrizAQP* e *BbrizMAPK*, respectivamente, durante o desenvolvimento do ovário de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*. Os transcritos *BbrizAQP* e *BbrizMAPK* tiveram a sua expressão restrita ao SE do tipo *Panicum* em estádios posteriores de desenvolvimento do ovário, sugerindo um importante papel na maturação do

SE durante o desenvolvimento de ovários das plantas apomíticas. Lacerda et al. (2013) caracterizaram três sequências de cDNAs de ovários de *B. brizantha* (CL 09, CL10, e CL21) que apresentaram similaridade com genes que codificam proteínas ribossomais, *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a*, e *BbrizRPL41*, as quais mostraram alta expressão em ovários, anteras e raízes, tecidos mitoticamente ativos quando comparados com as folhas. A expressão foi localizada em todos os estádios de desenvolvimento dos ovários, exceto para *BbrizS15a*, o qual foi detectado somente nas sinérgides de plantas apomíticas, esta expressão diferencial pode estar relacionada com o desenvolvimento autônomo da oosfera não reduzida. A expressão similar de *BbrizRPS8* e *BbrizRPL41* sugere que estes genes podem estar envolvidos em atividades de regulação do crescimento e desenvolvimento de ovários e anteras, independentemente do modo de reprodução.

A partir de um banco de cDNA construído com quatro diferentes bibliotecas de EST (*Expressed Sequence-Tags*), nos estádios de megasporogênese e megagametogênese, de ovários de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*, Silveira, et al. (2012) identificaram nove ESTs de expressão diferencial em ovários de plantas apomíticas, comparadas com os de plantas sexuais, quatro deles mostraram possível envolvimento nas etapas iniciais de diferenciação do SE do tipo *Panicum*, um sendo relacionado com a resposta ao estresse, *BbrizStill* (*Stress induced protein - St1*), outro com uma helicase, *BbrizHelic* e dois ESTs relacionados com a síntese de auxina, *BbrizSec13* (*Sec13 type protein*) e *BbrizRan* (*Ran related to GTP*). A alta expressão dos genes *BbrizStill*, *BbrizSec13* e *BbrizRan* foi observada por RT-qPCR em ovários jovens, nos momentos de diferenciação das células iniciais apospóricas.

Guimarães et al. (2013) analisaram e caracterizaram a expressão dos genes MADS-box de *B. brizantha*, similar ao *AGL6* de *Zea mays* e as análises filogenéticas indicaram que *BbrizAGL6* pertence à subfamília de proteínas semelhante ao gene *AGL6*. *BbrizAGL6* apresentou expressão diferencial em plantas sexuais e apomíticas, sendo restrita aos tecidos reprodutivos. Ovários de plantas sexuais mostraram maior expressão quando comparados com aqueles de plantas apomíticas, sendo a maior expressão encontrada no estágio II de plantas sexuais, correspondendo aos óvulos no estágio de megasporogênese. No desenvolvimento das anteras, a expressão de *BbrizAGL6* foi menor quando comparado com o desenvolvimento dos ovários. Transcritos de *BbrizAGL6* foram localizados na CMM de ovários apomíticos e sexuais e em regiões onde as células iniciais apospóricas se diferenciam, no nucelo de plantas

apomíticas, sugerindo um papel deste gene na megasporogênese de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*.

Outros genes tiveram expressão semelhante em *B. brizantha*, como no caso de transcritos de *BbrizSERK* que tiveram a sua expressão identificado por hibridização *in situ* somente na CMM de plantas sexuais, podendo indicar que na planta apomítica ocorre uma desregulação ou repressão de certos genes antes que a meiose aconteça, interferindo na viabilidade dos produtos da divisão meiótica (KOEHLER, 2010). Em *Poa pratensis* transcritos de *SERK* foram detectados em CMM de plantas sexuais, mas não em plantas apomíticas. Nesta, a expressão foi observada nas células nucelares neste mesmo estágio, sugerido que *PpSERK* participa no desenvolvimento dos SE de plantas apomíticas (ALBERTINI et al., 2005). Podio et al., (2014), em estudos com *Paspalum notatum* identificaram dois diferentes membros da família *SERK* (*PnSERK1* e *PnSERK2*) e sua expressão em tecidos vegetativos e reprodutivos de genótipos apomíticos e sexuais foi caracterizada. *PnSERK2* apresentou forte expressão nas células nucelares e em parte dos tegumentos de plantas apomíticas, e em plantas sexuais foi observado hibridização somente na CMM. Análise de expressão quantitativa mostrou que *PnSERK2* é significativamente mais expresso no genótipo de plantas apomíticas comparado com os sexuais na pré-meiose e pós-meiose, mas decresce na antese. *PnSERK2* parece ser ativo na planta CMM de plantas sexuais, mas reprimido no nucelo de plantas apomíticas. Estes resultados sugerem que a expressão diferencial de *PnSERK2* pode estar associado com a ocorrência de aposporia nesta espécie.

Quatro bibliotecas de RNA-Seq foram construídas a partir de cDNA de um *pool* de ovários, nos estádios de megasporogênese e megagametogênese, de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*. A montagem do transcriptoma foi realizada tendo como base o genoma de *Brachiaria ruziziensis* (SILVA et al., 2013) que gerou cerca de 31.000 transcritos, indicando um conjunto de genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento dos ovários de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha* (CARNEIRO et al., 2013). Nestas bibliotecas de RNA-Seq foram prospectados genes similares aos associados às vias de fitormônios e sua expressão comparada em ovários de *B. brizantha* em diferentes estádios de desenvolvimento. Entre eles: - *GID1* (*Gibberellin Insensitive Dwarf1*), receptor de giberelina, primeiramente identificado em arroz (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005), nomeado de *BbrizGID1*; - *IPT9* (*isopentenyltransferase 9*) de *A. thaliana* (TAKEI, et al., 2001),

relacionado com a biossíntese de citocinina, chamado de *BbrizIPT9* e - LOG (*LONELY GUY*), primeiramente caracterizado em arroz (Kurakawa et al., 2007), relacionado com a ativação da citocinina, nomeado *BbrizLOG*. Estes três genes foram selecionados e estudados neste trabalho, devido principalmente, a sua expressão diferencial detectada no banco de RNA-Seq.

Os genes *BbrizGIDI* e *BbrizLOG* apresentaram maior expressão no banco de RNA-seq de ovários de plantas apomíticas quando comparados com os dados de ovários de plantas sexuais, sendo o gene *BbrizGIDI* apresentou maior expressão nos estádios de megasporogênese (FERREIRA et al., 2017, Apêndice) e o *BbrizLOG* nos estádios de megagametogênese. Já o gene *BbrizIPT9* apresentou maior expressão no banco de RNA-seq de plantas sexuais em comparação com os dados de plantas apomíticas, tanto em estádios de megasporogênese e megagametogênese (CARNEIRO et al., manuscrito em preparação).

1.5 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

A. thaliana é uma das plantas modelo mais importantes no estudo de crescimento e desenvolvimento das plantas (Figura 3). Pertence à família Brassicaceae, que inclui plantas como *Brassica oleracea* (repolho) e *Brassica rapa* (nabo). *A. thaliana* oferece características importantes para a realização de pesquisas básicas em genética e biologia molecular, como ciclo de vida curto, de seis a oito semanas desde a germinação até a maturação das sementes, e seu pequeno tamanho e necessidades de crescimento tornam fácil à manutenção em espaços restritos. Além disso, é uma planta diplóide que realiza autofecundação e com uma grande produção de sementes, facilitando a rápida produção de progênies (MEINKE et al., 1998). Uma síliqua proviente de uma inflorescência forma em torno de 50 - 60 sementes. Seu genoma de 125 megabases foi sequenciado no ano 2000 e está organizado em cinco cromossomos e contém uma estimativa de 20.000 genes (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000) e hoje extensos mapas genéticos e físicos de todos os cinco cromossomos estão disponíveis. Além disso, *Agrobacterium tumefaciens* pode transformar eficientemente *A. thaliana* (CLOUGH, S. J.; BENT, 1998), permitindo a clonagem de genes, bem como a obtenção de mutantes e linhagens superexpressando genes.

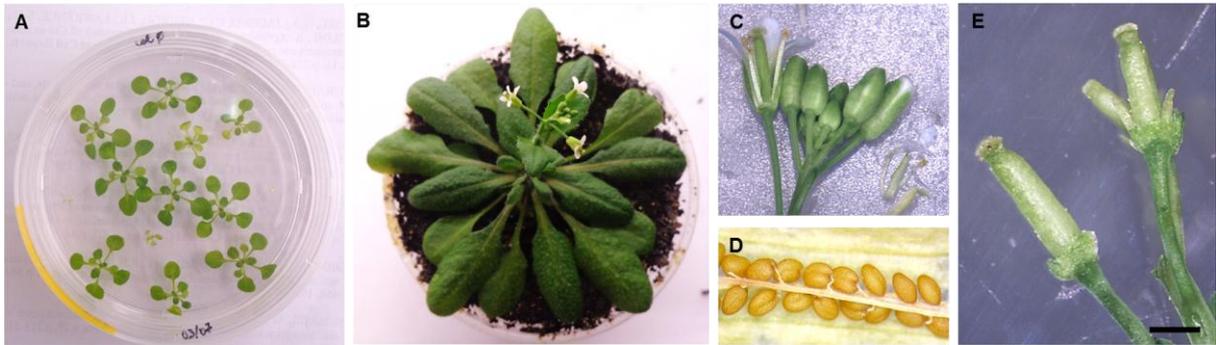


Figura 3. *Arabidopsis thaliana*. **A** - Plântulas de *A. thaliana* após 30 dias de germinação em meio MS (*Murashige e Skoog Basal Medium*). **B** - Planta em fase vegetativa e início da fase reprodutiva mostrando as primeiras inflorescências. **C** - Detalhe da inflorescência mostrando os botões florais em diversos estádios do desenvolvimento floral. **D** - Sementes maduras e **E** - Detalhe dos pistilos emasculados utilizados para fecundação cruzada, barra = 1mm.

A megasporogênese em *A. thaliana* tem sido amplamente descrita e compreende três eventos subsequentes, como também observado nas outras plantas de reprodução sexual: - formação da CMM a partir de tecido diplóide do óvulo emergente; - meiose para produzir megáspores haplóides e seleção do megásporo funcional que irá se desenvolver e constituir o gametófito feminino (GROSSNIKLAUS; SCHNEITZ, 1998).

Os óvulos iniciam o seu desenvolvimento emergindo como órgãos laterais da placenta, na fase de primórdios do óvulo, iniciando como uma protrusão em forma de dedos, estágio chamado de *finger-like* (Figura 4). Neste estágio uma célula subepidérmica distal do óvulo emergente forma a CMM diplóide. Enquanto isso, as células epidérmicas sofrem divisões para formar uma única camada de células, que cerca todo o óvulo, chamada camada L1 (SCHNEITZ, KAY et al., 1995; GROSSNIKLAUS; SCHNEITZ, 1998). O estágio *finger-like* é importante para analisar alterações na formação da CMM, pois é morfológicamente distinguível das células nucleares devido ao seu maior volume de citoplasma e núcleo e ainda não iniciou a fase de divisões celulares, além disso, alterações na formação inicial do óvulo também podem ser observadas. Em seguida, a CMM sofre meiose para formar quatro megásporos haplóides que se organizam do pólo mais distal do óvulo, região chalazal, ao pólo mais proximal, na região da micrópila (EDWARD et al., 1997; YADEGARI; DREWS, 2004). No período intermediário, os tegumentos começam a crescer e se diferenciam em tegumento interno e externo. Posteriormente, apenas o megásporo chalazal sobrevive e forma o megásporo funcional, enquanto os outros degeneram através da morte celular programada. Em *A. thaliana*, após o padrão monospórico de megasporogênese, inicia-se o padrão de

megagametogênese, que envolve divisões mitóticas do megásporo funcional, resultando em um sincício de quatro núcleos com dois núcleos para cada pólo. Ao final do processo de megagametogênese é formada uma estrutura de sete células constituída por três células antípodas no pólo chalazal, uma célula central diplóide, uma oosfera, e duas células sinérgicas no pólo micropilar, constituindo um SE do tipo *Polygonum*, característico de plantas sexuais (YANG et al., 2010) (Figura 4).

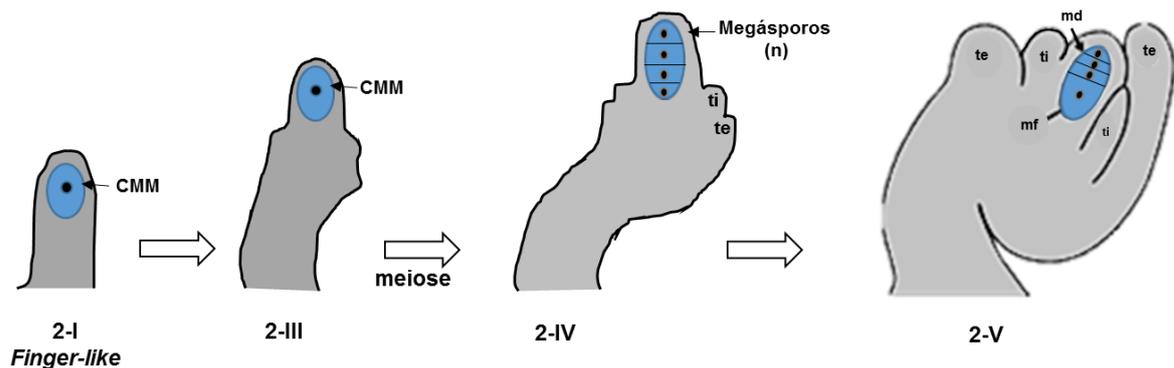


Figura 4. Esquema ilustrando as principais etapas da megasporogênese em *Arabidopsis thaliana*. Estádios sequenciais da megasporogênese (2-I (*finger-like*), 2-III, 2-IV e 2-V). A célula mãe do megásporo (CMM) se forma a partir de uma célula subepidérmica na extremidade distal do primórdio do óvulo. A CMM sofre meiose e forma quatro megásporos, três destes degeneram e o megásporo mais próximo à região chalazal sobrevive e se desenvolve no megásporo funcional, e irá passar para a fase de megagametogênese. Abreviações: md = megásporos em degeneração; mf = megásporo funcional; ti = tegumento interno; te = tegumento externo. Baseado em DREWS; KOLTUNOW (2011).

1.6 Fitormônios e sua relação com o desenvolvimento do óvulo

Os hormônios vegetais são reguladores químicos que induzem efeitos específicos no crescimento das plantas, e estão relacionados com uma variedade de funções importantes para o seu desenvolvimento. Entre as categorias de fitormônios relacionados à divisão celular, crescimento e diferenciação, destacam-se: auxinas, giberelinas, etileno, brassinosteróide, ácido abscísico e citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dentre eles, destacam-se as giberelinas, auxinas e citocininas que estão diretamente associados com o desenvolvimento do óvulo. Recentemente, os fitormônios têm sido relacionados com um papel fundamental no controle da iniciação do primórdio do óvulo, na formação do número de óvulos e também na correta formação dos tegumentos do óvulo (BARTRINA et al., 2011; CUCINOTTA et al., 2014; GOMEZ et al., 2016).

1.6.1 Giberelinas

As giberelinas constituem uma grande família de fitormônios diretamente relacionados ao desenvolvimento e crescimento das plantas, e induzem grande variedade de respostas, incluindo a germinação das sementes, a expansão foliar, alongamento do caule e raiz, maturação do pólen, indução floral e desenvolvimento da flor e óvulos. As giberelinas também são fatores fundamentais para a iniciação, crescimento e maturação do fruto. Plantas mutantes que são deficientes em giberelina exibem um fenótipo anão e florescimento tardio, e pelo tratamento com giberelina o crescimento normal é restaurado (DAVIÈRE; ACHARD, 2013).

O receptor de giberelina *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) e as proteínas *DELLA*, reguladores negativos das giberelinas, atuam na via de transdução de sinal da giberelina em *A. thaliana* e em arroz (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005; GRIFFITHS et al., 2006). *GID1* atua na via de transdução de sinal de giberelina, mediada por uma família de proteínas chamada *DELLA*, proteínas reguladoras transcricionais que possuem papel chave na repressão intracelular de resposta à giberelina (GAO et al., 2011). A ligação da giberelina bioativa ao receptor *GID1* causa alteração conformacional na extensão N-terminal do *GID1*, que restringe e recobre a giberelina, impedindo sua ação, e esta alteração conformacional também cria superfícies hidrofóbicas para a ligação de *DELLA*. A ligação de giberelina com *GID1* aumenta a interação entre *GID1* e *DELLA*, resultando na rápida degradação da proteína *DELLA* por meio da ligação do complexo ubiquitina ligase E3 ($SCF^{SLY1/GID2}$) o qual degrada a proteína *DELLA* via proteassoma 26S (SUN, 2010). Assim, a giberelina promove o crescimento da planta pela desestabilização e degradação das proteínas *DELLA*, assegurando o crescimento normal do órgão (HARTWECK; OLSZEWSKI, 2006; SUN, 2010; DAVIÈRE; ACHARD, 2013) (Figura 5).

Ueguchi-Tanaka et al. (2005) identificaram *GID1*, como o único tipo de receptor de giberelina em arroz, que codifica uma proteína com similaridade ao lipase hormônio-sensível (*LHS*). A análise da superexpressão de *GID1* em arroz mostrou fenótipo hipersensível à giberelina, apresentando um fenótipo de plantas altas, folhas longas de coloração verde claro e fertilidade reduzida quando comparado com o controle. Já mutantes *gid1* apresentaram insensibilidade à giberelina, sugerindo que o *GID1* é o único receptor de giberelina em arroz (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005).

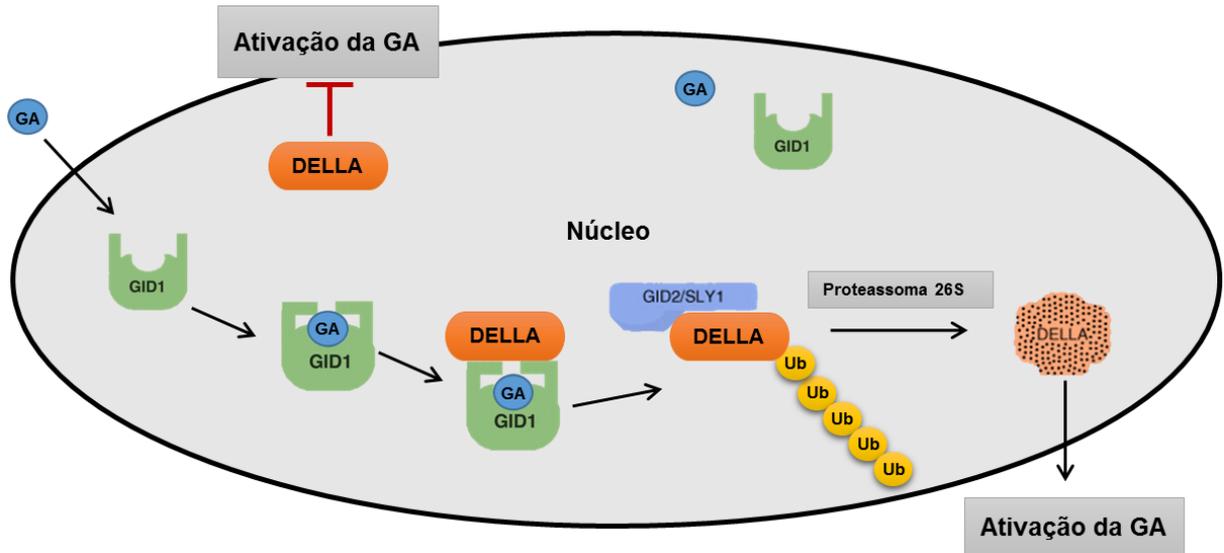


Figura 5. Esquema representando a atuação do receptor de giberelina (GID1) e sua ação integrada com a giberelina e as proteínas DELLA. Na presença de giberelina (GA), o receptor GID1 se liga ao fitormônio formando um complexo GID1-GA, que sofre uma alteração conformacional que proporciona a interação com a proteína DELLA, resultando na poliubiquitinação da proteína DELLA via complexo SCF^{GID2/SLY1} e, posteriormente, a proteína DELLA é degradada através da via do proteassoma 26S e, como consequência, a ação da giberelina é ativada. Na ausência de GA, sua ação é reprimida pela ação proteína DELLA. Baseado em HIRANO et al., (2008). GA: giberelina; Ub, ubiquitina.

Em *A. thaliana* foram identificados três genes ortólogos ao receptor de giberelina, *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c* (GRIFFITHS et al., 2006). Uma complementação funcional destes três genes ortólogos a GID1 em *A. thaliana* foi sugerida, pois a análise dos mutantes simples de cada um em separado não apresentou defeitos fenotípicos graves. A análise funcional dos duplos mutantes *gid1a gid1b* apresentou redução na fertilidade, enquanto os duplos mutantes *gid1a gid1c*, além da fertilidade reduzida, apresentaram frutos com comprimento reduzido e o duplo mutante *gid1b gid1c* não mostrou diferença fenotípica em relação às plantas do tipo selvagem (GRIFFITHS et al., 2006; GALLEGO-GIRALDO et al., 2014). O triplo mutante *gid1a gid1b gid1c* apresentou defeitos na morfologia do órgão floral, com redução de pistilos, ausência de crescimento da parte aérea e flores, resultando em uma planta anã e completamente infértil, fenótipo mais drástico do que aquele encontrado para mutantes *gal-3* que possuem deficiência extrema de giberelina. Além disso, este triplo mutante apresentou insensibilidade à adição de giberelina, indicando que GID1 (a, b, c) é o único receptor de giberelina em *A. thaliana* (GRIFFITHS et al., 2006).

Consistente com o papel da giberelina nos processos de regulação do crescimento ao longo do ciclo de vida da planta, a expressão dos genes *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c* foi

detectada em todos os tecidos analisados, sendo eles: flores, siliquis, caules, raízes e sementes, no entanto, algumas diferenças no perfil de expressão indicaram alguma especificidade em determinados tecidos. O padrão de expressão destes três genes em antese, foi analisado e caracterizado em *A. thaliana* utilizando construções com GUS, *pAtGID1::AtGID1-GUS*. GID1a apresentou sinal de expressão em todos os tecidos, envolvendo principalmente o SE, GID1b apenas na região chalazal do óvulo e GID1c apenas em válvulas, não apresentando expressão em óvulos (GALLEGO-GIRALDO et al., 2014).

As características fenotípicas do mutante *gid1-1* em arroz, tais como o fenótipo anão e a insensibilidade à giberelina, foram restauradas com a superexpressão dos genes *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c* de *A. thaliana* (NAKAJIMA et al., 2006), mostrando uma conservação natural de GID1 entre estas espécies.

Recentemente, foi apontada a primeira evidência sobre um papel da giberelina no desenvolvimento de óvulos e sementes de *A. thaliana* pelo estudo das proteínas DELLA (GOMEZ et al., 2016). Estas proteínas, reguladoras negativas de giberelina, participam na formação correta dos tegumentos do óvulo e no desenvolvimento de sementes, como analisado no mutante *della global* (o mutante quintuplo *gaiT6 rgaT2 rgl1-1 rgl2-1 rgl3-1*). Este mutante, sem a presença de proteínas DELLA, apresentou tegumentos curtos e nenhuma alteração entre as camadas de células dos tegumentos interno e externo, houve defeitos na formação da testa das sementes. Foi também verificado que o número de abortos aumentou e a densidade de sementes por fruto foi reduzida (GOMEZ et al., 2016).

Em *A. thaliana*, o papel do GID1 está associado ao crescimento e à maturação de frutos (GALLEGO-GIRALDO et al., 2014), no entanto, o papel do GID1 no desenvolvimento do óvulo ainda não está claro. Estudos relacionados ao GID1 podem contribuir para esclarecer os mecanismos subjacentes à giberelina no desenvolvimento do óvulo, bem como a sua participação no desenvolvimento diferencial inicial das plantas sexuais e apomíticas.

1.6.2 Auxinas

A auxina é um regulador chave para muitos aspectos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo a formação de órgãos florais e padrões de tecido vascular, além de estimular o crescimento diferencial em resposta a gravidade ou estímulos de luz (SONG et al., 2009; ZHAO, 2010). Para a formação da placenta e o desenvolvimento dos óvulos é necessária a presença de auxinas. A redução da biossíntese ou transporte de auxina local ocasiona defeitos graves no desenvolvimento do pistilo, com a consequente perda de tecido placentário e óvulos (NEMHAUSER et al., 2000).

Auxina é a chave reguladora para o destino de várias células na origem do primórdio floral (SONG et al., 2009). A diferença de concentração da auxina pode ser gerada por seu transporte apolar ou síntese localizada de auxina nas células, e pode fornecer a informação posicional necessária para a formação de um primórdio floral e tem papel essencial na especificidade e modelo de formação dos órgãos florais (CHENG et al., 2007). Análise de mutantes de *A. thaliana* com flores anormais mostrou que as mutações estavam relacionadas com aspectos da via de auxina. O número e a identidade de órgãos florais também foram drasticamente alterados em mutantes de auxina. A interrupção das vias de auxina afeta todos os tipos de órgãos florais, e causa enorme variação da floração, sugerindo que a formação dos órgãos florais depende de um gradiente de auxina local que é criado e mantido pela biossíntese de auxina e transporte polar. Se o sistema de transporte polar de auxina é comprometido, sua distribuição é interrompida e a formação dos órgãos florais é iniciada de acordo com a concentração de auxina local transiente que pode variar de um órgão floral para outro (CHENG et al., 2007).

O local de acúmulo de auxina fornece sinais posicionais para os múltiplos processos de desenvolvimento, tais como a formação e alongamento do meristema apical do eixo apical-basal, organogênese e diferenciação vascular (SU et al., 2011). Foi sugerida, além disso, a existência de um gradiente de auxina no SE feminino de *A. thaliana* o qual seria responsável pela especificação das células que o constituem (PAGNUSSAT et al., 2009), bem como a formação do primórdio do óvulo em *A. thaliana* (GALBIATI et al., 2013). Modelos teóricos matemáticos e experimentais não corroboraram a existência de gradiente de auxina suficiente o bastante para permitir uma especificação das células do SE feminino, sugerindo que os

efeitos da manipulação de auxina na produção e resposta sobre a determinação do destino da célula pode se dar de forma indireta (LITUIEV et al., 2013).

Yamada-Akiyama et al. (2009) analisaram a expressão de sequências de cDNA expressas em pistilos imaturos para identificar genes associados ao desenvolvimento do SE apospórico da espécie *Panicum maximum* que apresenta os dois modos de reprodução, apomítica do tipo apospórica e sexual. Foi encontrado dentre elas um EST (P4536) relacionado com a função hormonal, uma proteína de resposta à auxina (*Indoleacetic acid-induced protein 17*). O papel desta proteína no desenvolvimento de SE apospórico ainda não foi desvendado.

1.6.3 Citocininas

As citocininas são uma classe de fitormônios que possuem papel em muitos aspectos de crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo proliferação celular, dominância apical, mobilização de nutrientes, germinação da semente, padronização vascular e atividade cambial (WERNER et al., 2003; HWANG et al., 2012). Em *A. thaliana*, as citocininas estão relacionadas com um papel fundamental no início do desenvolvimento dos primórdios do óvulo, na formação do pistilo e na correta determinação do número de óvulos (BARTRINA et al., 2011; BENCIVENGA et al., 2012; CUCINOTTA et al., 2014). Os níveis de citocinina são regulados por um equilíbrio entre a biossíntese [*isopentenil transferase* (IPT)], a ativação [*Lonely Guy* (LOG)], inativação (*O-glucosil transferase*), reativação (β -glucosidase) e degradação [citocinina oxidase/desidrogenase (CKX)] (JAMESON; SONG, 2016).

Bencivenga et al., (2012) mostraram que os genes chave da via de citocinina, tais como os que codificam as *isopentenyltransferase* (IPT) e os receptores de citocinina, são expressos durante o desenvolvimento do óvulo. Estes autores mostraram que a citocinina regula o desenvolvimento do óvulo pela regulação do PINFORMED1 (PIN1). PIN1 é um dos mediadores de fluxo de auxina melhor estudados. Além disso, os fatores de transcrição BELL1 (BEL1) e sporocyteless/nozzle (SPL/NZZ), previamente descritos como reguladores chave da formação de óvulos, são necessários para as vias de sinalização de auxina e citocinina para o desenvolvimento do padrão correto do óvulo.

Os fatores de transcrição CUC1, CUC2 (*CUP-SHAPED COTYLEDON*) e ANT (*AINTEGUMENTA*) têm efeitos aditivos sobre a formação do primórdio do óvulo e no número de óvulos em *A. thaliana* (ISHIDA et al., 2000; GALBIATI et al., 2013), pois a

expressão dos genes *CUC1* e *CUC2* é necessária para regular a expressão de *PIN1* que ocasiona a formação da auxina máxima no local de formação dos primórdios do óvulo. Estes estudos indicaram que há diferentes funções, enquanto ANT promove o crescimento do primórdio do óvulo, os CUCs possuem um papel no estabelecimento da região limitante do primórdio do óvulo. Com base nestes resultados, foi proposto um modelo para descrever os mecanismos moleculares das fases iniciais do desenvolvimento do óvulo, que evidencia a convergência de auxina e citocinina na regulação da formação do primórdio do óvulo (GALBIATI et al., 2013) (Figura 6).

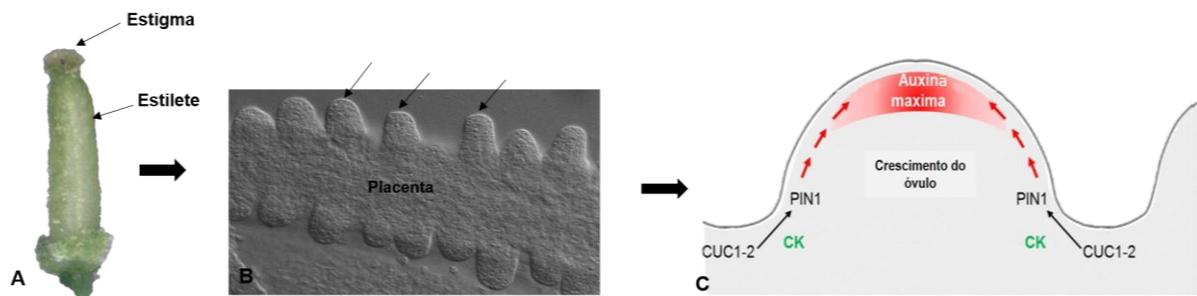


Figura 6. Representação esquemática da formação dos primórdios do óvulo de *Arabidopsis thaliana*. **A** – Flor emasculada, em que foram retiradas as pétalas, sépalas e estames. **B** - Detalhe da parte interna de um pistilo, setas indicam os primórdios dos óvulos em desenvolvimento na placenta. **C** - Modelo ilustrando a ação integrada de dois fitormônios, citocinina (CK) e auxina (transportador PIN1), para a formação do primórdio do óvulo. Baseado em Cucinotta et al., 2014.

Em *A. thaliana* também foi observado que o tamanho do pistilo está relacionado com as vias de regulação hormonal, auxina e citocinina. A análise do mutante triplo dos fatores de transcrição *crf2 crf3 crf6* (fatores de resposta a citocinina), mostrou uma redução no comprimento dos pistilos e no número dos óvulos. Os fatores de resposta a citocinina são necessários para regular a expressão de PIN1 (transportador de auxina) e consequentemente determinar o comprimento do pistilo. Após o tratamento das inflorescências com citocinina foi observado um aumento no comprimento do pistilo. Portanto, é provável que, quando houver espaço suficiente entre dois óvulos, os fatores de resposta a citocinina e/ou outros fatores dependentes de citocininas induzem a expressão de PIN1 para gerar uma concentração máxima de auxina, e assim, desencadear o desenvolvimento de novos primórdios do óvulo (CUCINOTTA et al., 2016).

Análises de estudos de expressão de ANT e de alterações fenotípicas em mutantes *ant* sugeriram que este fator de transcrição seja regulador na formação de primórdios dos óvulos

em *A. thaliana* (ELLIOTT et al., 1996). Hibridização in situ de *ANT* indicou expressão na placenta e nos tegumentos dos óvulos em desenvolvimento, enquanto os mutantes *ant* apresentaram tegumentos não desenvolvidos e interrupção da megasporogênese no estágio de tétrade, ocasionando a completa esterilidade feminina (ELLIOTT et al., 1996). Além da importância de *ANT* para o desenvolvimento do óvulo, verificou-se posteriormente seu envolvimento com a formação do primórdio do óvulo pela análise do mutante *ant-9*. Este mutante apresentou o número de óvulos reduzidos pela metade quando comparado com o controle, no entanto, não houve alteração no comprimento do pistilo, sugerindo a participação de *ANT* somente na formação dos primórdios dos óvulos em *A. thaliana* (LIU et al., 2000).

BARTRINA et al. (2011) analisaram o duplo mutante *ckx3 ckx5* (*cytokinin oxidase/dehydrogenase3*) de *A. thaliana* em que a degradação de citocinina é afetada. Estes duplos mutantes apresentam um aumento significativo no número de primórdios florais e geraram 40% mais siliquis e conseqüentemente produziram duas vezes mais óvulos quando comparado com as plantas selvagens. Além disso, o duplo mutante *ckx3 ckx5* apresentou tamanho e a atividade do meristema apical alterados, apresentando uma maior espessura com diâmetro de 15% maior. Já a superexpressão dos genes *CKX* mostraram uma drástica diminuição do meristema de inflorescência e a produção de apenas dois estádios florais. Estes resultados corroboram o importante papel da citocinina no desenvolvimento reprodutivo, pois a alta quantidade de citocinina causou um aumento de aproximadamente 55% no rendimento das sementes. Além disso, o aumento no nível de citocinina causou alterações no padrão estrutural do óvulo, com a formação de uma estrutura única como tegumento, sem a diferenciação das camadas que formam o tegumento interno e externo do óvulo. Plantas com redução na produção ou percepção de citocinina apresentam comprometimento na formação ou redução no número de óvulos, e após o tratamento com citocinina externa (6-Benzylaminopurine, BAP), novos primórdios de óvulos são observados, com média de 20 ± 3 em cada pistilo, entre os óvulos já formados antes da aplicação externa de citocinina (BENCIVENGA et al., 2012).

Plantas mutantes homozigotas para os receptores de citocinina (*CRE1*, *AHK2* e *AHK3*) sugerem que estes genes nas células haplóides são indispensáveis para o desenvolvimento de gametófitos masculinos e femininos (BENCIVENGA et al., 2012). Os mutantes triplos formam poucas flores, mas não formam sementes, indicando que o crescimento reprodutivo é prejudicado, além de apresentarem interrupção da deiscência das

anteras mutantes e diminuição na germinação do pólen. Kinoshita-Tsujimura & Kakimoto (2011), analisaram 73 óvulos obtidos destes triplos mutantes para receptores de citocinina (*ahk2-2tk ahk3-3 cre1-12*) e verificaram que 64 deles apresentavam graves defeitos na estrutura dos óvulos, sendo a grande maioria (57 óvulos), sem a formação do SE. Estes resultados sugerem que os receptores de citocininas são indispensáveis para a maturação das anteras e deiscência, indução da germinação do pólen pelo estigma, formação e maturação do SE (KINOSHITA-TSUJIMURA; KAKIMOTO, 2011). Os triplos mutantes *ahk2-7 ahk3-3 cre1-12*, deficientes em citocinina, também mostraram morfologia celular alterada nos tegumentos internos e elevada atividade mitótica, sugerindo que a citocinina regula negativamente a proliferação celular nos tecidos esporofíticos em torno do SE em desenvolvimento. Utilizando um marcador mitótico, *cyclinB:GUS*, foi possível observar que a desorganização das camadas do tegumento interno pode ser ocasionada por defeitos na divisão celular (CHENG; KIEBER, 2013).

As citocininas mais comuns são derivadas de N6-isopentenyladenine (iP). iP carrega uma cadeia lateral de isopentenil não modificada, enquanto que as citocininas do tipo *trans*-zeatin (*tZ*) e *cis*-zeatin (*cZ*) transportam cadeias laterais hidroxiladas. Em *A. thaliana*, as citocininas de tipo iP e tZ são sintetizadas pelas ATP/ADP isopenteniltransferases (IPTs), enquanto as citocininas do tipo cZ são sintetizadas pelas tRNA IPTs (MIYAWAKI et al., 2006). Em plantas duas classes de IPTs são encontradas: ATP/ADP IPTs (*AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT4*, *AtIPT5*, *AtIPT6*, *AtIPT7* e *AtIPT8*) e tRNA IPTs (*AtIPT2* e *AtIPT9*). ATP/ADP IPTs são responsáveis pela maior parte da síntese de citocinina, enquanto as do tipo cZ são produzidas possivelmente por degradação de tRNA de *cis*-hidroxi isopentenil (MIYAWAKI et al., 2006) (Figura 7). As IPTs são codificadas por uma pequena família multigênica. Todos os genes são distribuídos ao longo dos cinco cromossomos de *A. thaliana* (TAKEI et al., 2001).

O perfil de expressão dos genes ATP/ADP IPTs foi diferenciado em tecidos celulares específicos e a localização da expressão de cada tipo de IPT foi amplamente distribuída ao longo da planta (MIYAWAKI et al., 2004). A análise dos vetores *GUS::AtIPTs* revelaram que *AtIPT1* é expresso em células precursoras do xilema em raiz, folhas, tegumentos dos óvulos e sementes imaturas; O *AtIPT3* é expresso em tecidos de floema; *AtIPT4* e *AtIPT8* são expressos nos estádios iniciais de desenvolvimento das sementes imaturas, com maior expressão na região chalazal do endosperma; *AtIPT5* é expresso no primórdio de raízes

laterais e na ponta da raiz; *AtIPT7* é expresso em folhas jovens e na região de alongamento da raiz. *AtIPT2* e *AtIPT9* são isopenteniltransferases tRNA apresentando forte expressão em tecidos em proliferação, incluindo a raiz e os meristemas apicais, e o primórdio das folhas. Alterações nas concentrações de nutrientes minerais, auxina ou citocinina não provocaram alterações de expressão dos vetores *AtIPT2::GUS* e *AtIPT9::GUS* (MIYAWAKI et al., 2004).

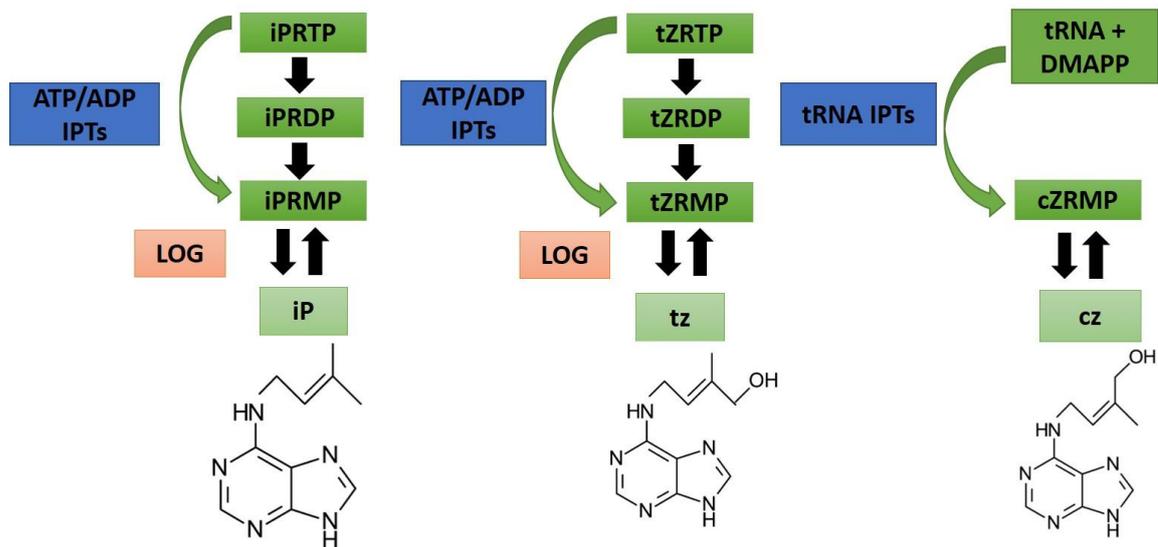


Figura 7. Resumo esquemático do metabolismo de citocinina e etapas centrais da via de sinalização da citocinina. Em *Arabidopsis thaliana*, as citocininas de tipo iP e tZ são sintetizadas pela *adenosina fosfato* isopenteniltransferases (ATP/ADP IPTs), enquanto as citocininas do tipo cZ são sintetizadas pelas tRNA IPTs. iPRTP, iPRDP, tZ RTP e tZ RDP são desfosforilados por fosfatases e iPRMP e tZ RMP podem ser diretamente convertido em bases livres ativas pelo *cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase* (LOGs). Baseado em Werner & Schmulling, (2009).

MIYAWAKI et al. (2006) analisaram mutantes simples e duplos para os nove genes *IPTs* e não observaram fenótipos visíveis, apenas o mutante simples *atipt9* e o duplo mutante *atipt2 9* eram frequentemente cloróticos. Entre os triplo mutantes apenas o *atipt3 5 7* e o quádruplo *atipt1 3 5 7* apresentaram fenótipos, como a redução do meristema apical, redução do número de folhas, parte aérea curtas e finas, raízes primárias maiores e maior comprimento de raízes laterais. Estes mutantes tiveram parte destes fenótipos recuperado com a inserção do gene *AtIPT3*, indicando uma sobreposição na função destes genes. Por outro lado, as plantas transgênicas que superexpressaram os *IPTs* mostraram aumento do tamanho das plântulas geradas, redução da dominância apical e atraso na senescência em *Petunia hybrida* (ZUBKO et al., 2002) e apresentou interrupção no crescimento e desenvolvimento logo após a germinação em *A. thaliana* (SUN et al., 2003).

Em *A. thaliana* a principal via de ativação de citocinina é realizada por uma família gênica composta por nove genes *LOG-like* (KUROHA et al., 2009). Análises morfológicas e metabólicas demonstraram que os *AtLOGs* estão envolvidos na via de ativação direta da citocinina em *A. thaliana*, sendo fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal da planta (KUROHA et al., 2009). Análises de expressão de *AtLOGs::GUS* revelaram expressão diferencial de *AtLOGs* em vários tecidos durante o desenvolvimento da planta, com sobreposição em alguns tecidos. Em órgãos reprodutivos foi detectada a expressão de *AtLOG1* em flores imaturas e tecido vascular dos pistilos. A expressão de GUS foi detectada no funículo dos óvulos para o gene *AtLOG2*. A expressão de *AtLOG4* foi observada em inflorescências jovens e na parte basal dos óvulos. A expressão de GUS para o gene *AtLOG5* foi detectada em botões florais, flores maduras e óvulos (KUROHA et al., 2009). A sobreposição parcial de padrões de expressão dos genes *AtLOGs* e nenhum fenótipo visível de mutantes simples sugeriram que estes genes desempenham funções redundantes durante o desenvolvimento da planta. O mutante triplo *log3 log4 log7* apresentou atraso no crescimento da inflorescência, resultando em diminuição do número de flores e na altura da planta, sugerindo uma atividade meristemática de inflorescência reduzida. No entanto, mostrou um aumento na formação e no número de raízes laterais. A superexpressão dos *AtLOGs*, *35Spro:LOG2*, *35Spro:LOG4* e *35Spro:LOG7*, gerou fenótipo semi-anão com aumento do número de caules laterais, indicando uma dominância apical reduzida. Além disso, os mutantes apresentaram retardamento na senescência das folhas, com sementes de comprimento e peso maiores. O número de raízes laterais emergentes diminuiu (KUROHA et al., 2009).

Em arroz, mutantes *log* apresentaram defeitos ocasionados na manutenção da atividade meristemática de plântulas, que podem ser ocasionados pela diminuição do nível da citocinina ativa no meristema apical. Os órgãos florais internos foram afetados de forma mais drástica do que os órgãos externos em todos os mutantes alélicos examinados. Estes mutantes *log* apresentaram redução no tamanho da panícula e alterações nos padrões de ramificação. O número de órgãos florais também diminuiu nos mutantes, e as flores geralmente apresentaram somente um estame, e pistilos e óvulos não foram formados, causando a completa infertilidade na planta (KURAKAWA et al., 2007).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a expressão de genes associados a via de fitormônios disponíveis em bibliotecas de RNA-Seq de ovários de *B. brizantha*, com a diferenciação de SE característica de plantas de reprodução por apomixia.

2.1 Objetivos específicos:

- Determinar a sequência dos fragmentos dos genes encontrados em bancos de RNA-Seq de ovários de *B. brizantha* e verificar a similaridade com genes disponíveis em bancos de dados;
- Validar biologicamente a expressão diferencial de sequências de cDNA, de genes associados com as vias de fitormônios, em ovários de *B. brizantha*;
- Determinar o número de cópias dos genes em estudo nos genótipos sexual e apomítico de *B. brizantha*;
- Localizar espacialmente os transcritos, em ovários e anteras, das sequências de expressão diferencial em ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual.
- Analisar as linhagens transgênicas de *A. thaliana* com o vetor *pAtGID1::AtGID1-GUS* para localizar a expressão dos genes *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c*, por meio do ensaio GUS;
- Avaliar a função dos genes em estudo em plantas modelo de *A. thaliana*;
- Analisar o desenvolvimento do óvulo e caracterizar morfológicamente e fenotipicamente as plantas transgênicas superexpressas *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a* e mutantes de *A. thaliana*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Dois acessos de *B. brizantha* cultivados no campo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram usados neste trabalho: BRA 002747, diplóide ($2n=2x=18$) sexual e BRA 00591, tetraplóide ($2n=4x=36$) apomítico facultativo chamado *B. brizantha* (A. Rich) Stapf cv. Marandu, com 98% de aposporia (ARAUJO et al., 2007).

A. thaliana selvagem (ecótipo Columbia) e as linhagens transgênicas *pAtGID1a::AtGID1a-GUS*, *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* e *pAtGID1c::AtGID1c-GUS* (SUZUKI et al., 2009; GALLEGO-GIRALDO et al., 2014), fornecido por Dr. Perez-Amador, foram cultivadas em sala de crescimento a 22 °C sob condições de dia longo (16 h de luz e 8 h de escuro). Mutante *ipt9* de *A. thaliana* foi adquirido na *Arabidopsis Biological Resource Center* e desenvolvidos no *Salk Institute* código SALK_027711. O mutante foi genotipado por PCR, utilizando os iniciadores 5'- GCTACGCCACATAAAGGAAT-3' e 3'- ACGGTTCCGGTTAGGTTTACA-5' para amplificação de fragmentos provenientes de uma planta selvagem de 765 pares de bases (pb). Para verificar se as plantas eram mutantes homocigotas utilizou-se o iniciador 3'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-5' para a amplificação do T-DNA juntamente com o iniciador 5'- GCTACGCCACATAAAGGAAT-3', que gerou uma banda mutante de 350 pb. Os heterocigotos possuíam os dois fragmentos.

3.2 Coleta e extração de RNA

Ovários de ambos os acessos de *B. brizantha* foram coletados e extraídos nos estádios de desenvolvimento relativos à megasporogênese, estádios I e II, e megagametogênese, estádios III e IV (ARAUJO, et al., 2000; RODRIGUES et al., 2003). Os ovários foram excisados dos pistilos utilizando microscópio estereoscópico Zeiss-Stemi SV11, armazenados em tubos de microcentrífuga em nitrogênio líquido e mantidos em freezer a -80°C.

Em tubo de microcentrífuga contendo 250 ovários de *B. brizantha* foram adicionados 250 µL do reagente Trizol® (Invitrogen), e os ovários macerados por 30 segundos com pistilo de polietileno. Foram adicionados ao macerado 25 µL de uma solução contendo clorofórmio: álcool isoamílico (24:1; v/v). O material foi homogeneizado 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 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 por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. Posteriormente, seguiu-se nova centrifugação de 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA ressuspensionado em 20 µL de água. 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 e a pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDropTechnologies™). Para síntese de cDNA, 2 µg de RNA foram utilizados na reação de transcriptase reversa usando *SuperScript III* (Invitrogen) de acordo com protocolo indicado pelos fabricantes.

Em plantas de *A. thaliana*, o RNA total foi extraído de 1-2 inflorescências em três réplicas biológicas de plantas selvagens, mutantes e transgênicas, utilizando NucleoZOL® (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante. As inflorescências de *A. thaliana* congeladas em nitrogênio líquido foram maceradas por 30 segundos com pistilos de polietileno. Foram adicionados ao macerado 500 µL do reagente NucleoZOL®, incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 12.000 rpm 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 temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. Posteriormente, seguiu-se nova centrifugação de 7.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA ressuspensionado em 50 µL de água. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL. O RNA total foi tratado com a *Ambion TURBO DNA-free DNase* (Invitrogen) e a transcrição reversa foi realizada utilizando o sistema de transcrição reversa *ImProm-II*™ (Promega).

3.3 Reações de RT-qPCR

Foi realizada RT-qPCR em ovários de *B. brizantha* em diferentes estádios do desenvolvimento usando RNA extraído em triplicata a partir de um *pool* de ovários de plantas sexuais e apomíticas. Cada amostra representa um conjunto de 250 ovários coletados de

acordo com os estádios de desenvolvimento de diferentes plantas, sendo elas apomíticas ou sexuais, e as réplicas chamadas de réplicas biológicas. Cada reação de PCR quantitativo foi realizada em um volume final de 20 μL , contendo 10 μL da mistura *Syber Green Rox Plus* (LGC Biotecnologia), 5 μL do cDNA diluído na proporção de 1:100, 0,5 μL de cada iniciador (0,25 μM) e 4 μL de água Milli-Q. Para a reação de RT-qPCR foram utilizadas amostras em triplicata biológica e um controle negativo (sem DNA molde). O programa utilizado foi: 15 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C e 20 segundos a 72°C. A curva de dissociação foi feita de 60 °C a 95 °C por 20 minutos em aparelho Mastercycler Eppendorf Realplex (EppendorfTM). Os dados obtidos pela leitura da fluorescência foram exportados para planilha MS Excel (Microsoft) e a análise dos dados foram feitos utilizando método $\Delta\Delta\text{Ct}$, tendo como controle endógeno o gene que codifica a enzima conjugadora de ubiquitina, previamente estabelecido como um gene de expressão estável, *BbrizUBCE*, caracterizado por SILVEIRA et al., (2009).

Análises de RT-qPCR também foram realizadas para as plantas selvagens, mutantes e transgênicas de *A. thaliana*. Cada reação de RT-qPCR foi realizada em um volume final de 12 μL , contendo 6 μL da mistura *SYBR Green PCR Master Mix* (Bio-Rad), 1 μL do cDNA diluído na proporção de 1:100, 0,5 μL de cada iniciador (0,25 μM) e 4 μL de água destilada. Para a reação de RT-qPCR foram utilizadas amostras em três réplicas técnicas de cada uma das três réplicas biológicas e um controle negativo (sem DNA molde). A análise relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o iQ5 Multicolor Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) e o programa utilizado foi: 3 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C e 20 segundos a 72°C. Os dados obtidos foram exportados para planilha MS Excel (Microsoft) e a análise dos dados foram feitos utilizando método $\Delta\Delta\text{Ct}$, tendo como controle endógeno os genes *UBIQUITIN10* (CZECHOWSKI et al., 2005) e *ACTIN2-8* (YONG-QIANG et al., 1996).

Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (versão 0.4.0) nos seguintes parâmetros: tamanho do fragmento amplificado entre 100 e 200 pb, temperatura de anelamento entre 58 – 60 °C, e tamanho dos iniciadores entre 19 – 21 pb. As sequências dos iniciadores são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores utilizados para análise da expressão relativa por RT-qPCR, dos genes em estudo.

Genes	Sequências
<i>BbrizGID1</i>	5' TCAAGCTCGTGTACCGCGAG 3' 3' CTGAGGAAGTCGGCGATCTC 5'
<i>BbrizIPT9</i>	5' GAGATCATCAGCGCCGACTC 3' 3' GGACAGGGACTGGTACTGGAAG 5'
<i>BbrizLOG</i>	5' GCCGTGGAGGAAGGGTTCATCA 3' 3' GCCCATCTCCCAGTTGAGCGTG 5'
<i>BbrizUBCE</i>	5' GGTCTTGCTCTCCATCTGCT 3' 3' CGGGCTGTCGTCTCATACTT 5'
<i>AtGID1a</i>	5' GCTGCGAGCGATGAAGTT 3' 5' CTGTTACGGAACCCAATTC 3'
<i>UBIQUITIN10</i>	5' CTGTTACGGAACCCAATTC 3' 3' GGAAAAAGGTCTGACCGACA 5'
<i>ACTIN2-8</i>	5' CTCAGGTATTGCAGACCGTATGAG 3' 5' CTGGACCTGCTTCATCATACTCTG 3'

3.4 Hibridização in situ em ovários de *B. brizantha*

3.4.1 Amplificação do fragmento utilizado como sonda

Utilizou-se como moldes para elaboração da sonda para hibridização in situ, os fragmentos de cDNA dos genes *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG*, selecionados com base na expressão diferencial de ovários apomíticos e sexuais de *B. brizantha*. Os fragmentos foram amplificados com outros iniciadores para a obtenção de um fragmento maior, cerca de 300 a 1000 pb (Tabela 2), utilizando como molde um *pool* de cDNA de diferentes estádios de plantas apomíticas e sexuais.

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores utilizados para a construção da sonda para hibridização in situ referentes aos genes *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG*.

Genes de <i>Brachiaria brizantha</i>	Sequências	Tamanho do fragmento amplificado
<i>BbrizGID1</i>	5' GGACAGGGACTGGTACTGGAAG 3' 3' CTGAGGAAGTCGGCGATCTC 5'	300 pb
<i>BbrizIPT9</i>	5' GAGATCATCAGCGCCGACTC 3' 3' CTCTCATTGCGGAACCAGGTAAGC 5'	866 pb
<i>BbrizLOG</i>	5' ATGACGATGAGGCAGTCGAG 3' 3' GCCCATCTCCCAGTTGAGCGTG 5'	606 pb

A reação de PCR foi feita com um volume final de 50 µL, em solução contendo: 2µL de cDNA; 5 µL de tampão 10X (Invitrogen); 50 mM MgSO₄; 2,5 mM dNTP; 10 µM iniciadores (*Forward/Reverse*); 2,0 U de Taq High Fidelity Platinum (Invitrogen). Uma reação sem o DNA molde foi utilizada como controle negativo. O programa de amplificação utilizado foi de 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 56 °C por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C, em termociclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

O fragmento amplificado foi recortado do gel de agarose 1,5% e os produtos foram purificados usando o kit *Wizard® SV Gel e PCR clean-up system* (Promega). A verificação da integridade e a estimativa da concentração do produto purificado foram feitas por eletroforese

em gel de agarose 1,2% e corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL, utilizando como parâmetro o marcador com peso molecular *Low DNA Mass Ladder*[®] (Invitrogen). As amostras também foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDropTechnologies[™]).

3.4.2 Clonagem do fragmento a ser utilizado como sonda

A ligação do fragmento de PCR purificado foi realizada usando o vetor pGEM[®]-T *Easy Vector Systems* (Promega) (Figura 8), em uma reação de volume final de 10 µL. A ligação do inserto no vetor foi feita com a enzima T4 DNA ligase (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Os vetores pGEM[®]-T e pGEM[®]-T *Easy* são aproximadamente de 3kb e possuem a concentração de 50 ng/µl. Para calcular a quantidade apropriada de produto de PCR (inserto) a ser colocada na reação de ligação, utilizou-se a seguinte equação: $\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto kb} \div \text{tamanho do vetor kb} \times \text{razão molar inserto:vetor}$.

Células competentes foram preparadas segundo protocolo descrito por SAMBROOK; RUSSELL, (2001). Uma cultura de *E. coli XL 1 Blue* (Clontech[®]) foi plaqueada em meio LB (Luria Bertani) ágar e incubada a 37 °C por 16 horas. A partir de uma colônia isolada foi realizado um pré-inóculo, em meio LB líquido, incubado por cerca de 16 horas sob agitação de 180 rpm, a 37 °C. Um volume correspondente a 1/100 do pré-inóculo foi diluído em 1L de meio LB líquido (bactotripton 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 0,5%) e incubado sob agitação vigorosa, a 37 °C até atingir a densidade óptica de (A_{600}) de 0,6. Após atingir a A_{600} desejada, a cultura foi mantida no gelo por 30 minutos e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. As bactérias foram ressuspensas em 500 mL de água 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%. O material foi dividido em alíquotas de 40 µL e estocado a -80 °C.

A transformação em *E. coli XL 1 Blue* foi feita por eletroporação, utilizando 5 µL da ligação (contendo o fragmento a ser inserido) e 40 µL de células competentes. 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. Após a transformação, cerca de 100 µL, foi plaqueado em meio

LB ágar, contendo 100 µg de ampicilina, 20 µg tetraciclina, 20 µg de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), 0,1 mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), sendo mantidas a 37 °C por 16 horas. As colônias brancas foram selecionadas e crescidas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina 100 mg/L e tetraciclina 20 mg/L.

Para confirmar a presença do inserto foi realizado uma reação de PCR com as colônias selecionadas, utilizando os iniciadores específicos para cada gene e seguindo as mesmas condições de amplificação descritas anteriormente. O clone utilizado para a síntese da sonda para a hibridização in situ foi estocado em glicerol 15% a -80 °C.

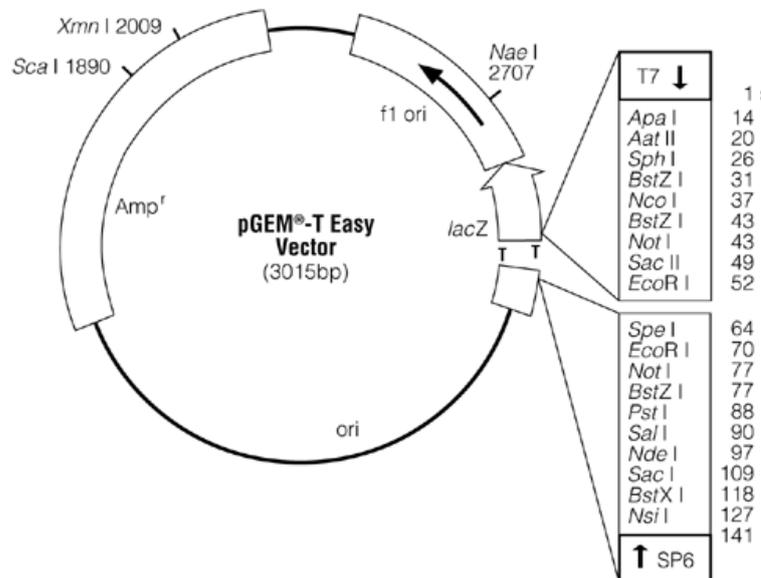


Figura 8. Esquema do vetor pGEM® -T Easy Vector Systems (Promega) utilizado para clonagem das sequências gênicas utilizadas para o preparo das sondas de hibridização in situ, contendo os sítios de iniciação da RNA polimerase T7 e SP6, e sítios de enzimas utilizadas para linearização do plasmídeo.

3.4.3 Extração do plasmídeo por lise alcalina

Para extração do DNA plasmidial a suspensão bacteriana foi centrifugada durante 1 minuto a 12.000 rpm. O meio LB foi descartado e as bactérias ressuspensas em 100 µL da solução I (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, Glicose 50 mM), 200 µL da solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1%) preparada na hora. As amostras foram homogêneas por inversão e colocadas no gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 150 µL da solução III (KOAc 5 M e HOAc), as amostras foram homogêneas vigorosamente e incubadas no gelo

por mais 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes transferidos para tubos novos. A precipitação das amostras foi realizada com o dobro de volume de etanol absoluto e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Ressuspendeu-se o DNA plasmidial em 30 μ L de água estéril Mili-Q.

Para confirmação da presença do inserto no vetor, o DNA plasmidial contendo as sequências amplificadas foi clivado com a enzima de restrição *EcoRI* a 37 °C por 1 hora e os fragmentos visualizados em gel de agarose a 1%, pois a enzima *EcoRI* corta o vetor em duas regiões e libera o fragmento inserido no vetor sendo possível comparar o tamanho do fragmento observado e o esperado.

3.4.4 Sequenciamento

O sequenciamento dos clones contendo o fragmento dos genes *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* de *B. brizantha* foi realizado em sequenciador automático de DNA ABI Prism 3700 – Applied Biosystems na MACROGEN (Seul, Coreia do Sul). Foram sequenciados clones positivos de plantas apomíticas e sexuais, na concentração de 100 ng/ μ L, e foram usados os iniciadores universais T7 e SP6, na concentração de 3,2 pmoles cada e 2 μ L de Mix do *Big Dye 3.1 Kit* (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado para verificar se a amplificação e clonagem dos fragmentos foram realizadas corretamente e não há mutações na sequência gênica.

3.4.5 Linearização dos plasmídeos

Os plasmídeos contendo os fragmentos que foram utilizados como sonda para a hibridização in situ foram linearizados com as enzimas de restrição selecionadas dependendo da sequência do gene, para *BbrizGID1* foram utilizadas as enzimas *NcoI* e *SalI*, *BbrizIPT9* *SpeI* e *SacII*, e *BbrizLOG* as enzimas *NcoI* e *PstI*. A linearização foi realizada em volume final de 20 μ L, contendo aproximadamente 10 μ g do plasmídeo linearizado, duas enzimas selecionadas para que a transcrição termine logo após o inserto, e incubação a 37 °C por 2 horas e 30 minutos. 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 3 M, pH 5,5 e etanol absoluto (1:10; v/v), a -20 °C por 2 horas e 30 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70%, e depois de seco, ressuspendido em 25 μ L de água DEPC (0.1% diethylpyrocarbonate) e armazenado a -20 °C.

3.4.6 Transcrição e marcação da sonda

As sondas de mRNA, senso e anti-senso, foram sintetizadas por transcrição *in vitro*, a partir dos fragmentos de cDNA clonados no vetor pGEM®-T *Easy*, utilizando o *DIG RNA Labeling Kit* (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado 1 µg do DNA molde purificado e água DEPC para um volume final de 13 µL e utilizadas as RNAs polimerases SP6 e T7, para a transcrição das sondas senso e anti-senso, dependendo do sentido de inserção do fragmento no vetor. A integridade da sonda foi verificada e quantificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

Para confirmar a marcação da sonda, senso e anti-senso, 1 µL de cada sonda sintetizada (SP6 e T7) e alíquotas do controle positivo *DIG RNA Labeling Kit* (SP6/T7) (Roche) foram colocadas em membrana de náilon Amersham Hybond™ -N⁺ (GE Healthcare), previamente umedecida em solução de Tris-HCl 10 mM pH 7.5. O RNA foi fixado na membrana por crossing link (12 segundos). A membrana foi lavada com solução de detecção 1 (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M) e em seguida incubada por 30 minutos no tampão de bloqueamento (*Blocking reagent* - Roche). Posteriormente, a membrana foi incubada por 30 minutos com o anticorpo conjugado *Anti-Digoxigenina AP Fragments* (Roche) diluído em 2: 5000 em tampão de detecção 1. Em seguida, a membrana foi exposta com a solução de coloração BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 0,05 g/mL)/NBT (nitro-blue tetrazolium chloride 0,05 g/mL) (Sigma) por 30 minutos. A reação de coloração da membrana foi finalizada pela adição da solução tampão 4 (Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM). A concentração da sonda marcada foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando como padrão o marcador *Low DNA Mass Ladder*. A concentração da sonda foi ajustada para 10 ng/µL, como solução estoque para o preparo da solução de hibridização.

3.4.7 Preparação das lâminas para a hibridização *in situ*

Para a preparação das lâminas, foram inicialmente coletados os pistilos de *B. brizantha* apomítica e sexual em estádios de desenvolvimento, antes da antese. As amostras foram dissecadas com auxílio de um microscópio estereoscópio e imersas imediatamente em solução fixadora contendo paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,25% em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,2. As amostras foram submetidas ao vácuo por 1 hora à temperatura ambiente. A solução fixadora foi renovada e as amostras mantidas a 4°C durante 24 horas.

Em seguida o fixador foi removido e as amostras lavadas com tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0 e desidratadas em série etílica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%), 1 hora cada. Posteriormente, as amostras foram embebidas em séries crescentes de etanol:BMM (butyl methyl metacrilato) nas proporções 5:1, 5:3, 5:4, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5; v/v e BMM puro, por no mínimo 24 horas em cada etapa, para evitar bolhas e artefatos técnicos no material fixado. As amostras foram colocadas em cápsulas plásticas contendo BMM, e polimerizadas por irradiação com luz ultravioleta por 48 horas a 4 °C e em seguida estocadas a -20 °C. Secções semi-finas de 3,5 µm foram obtidas em ultramicrótomo Leica Ultracut-UCT, com navalha de vidro e colocadas sobre lâminas RNase Free *ProbeOn™ Plus Microscope Slides Charged and Prcleaned* (FisherBiotech) em gotas de água tratada com DEPC. As lâminas foram mantidas por 48 horas em placa aquecedora a 60 °C e armazenadas a 4 °C até o momento do uso.

Antes da reação de hibridização, as lâminas contendo as secções foram colocadas em cubas de vidro para a remoção da resina BMM por duas lavagens sucessivas em acetona por 10 a 15 minutos cada, uma lavagem com acetona:água tratada com DEPC (1:1) por 5 minutos, e duas lavagens com água tratada com DEPC por 5 minutos cada.

A preparação do material biológico também foi realizada utilizando a parafina. A inclusão do material biológico em parafina foi realizado pela imersão em séries crescentes de etanol:xilol nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3 e xilol puro, posteriormente, o xilol foi gradativamente sendo substituído por parafina, em estufa a 58 °C. Para a montagem do bloco, as amostras foram colocadas em formas de metal contendo parafina em placa preaquecida a 58 °C, e polimerizadas após o desligamento da placa aquecedora e o resfriamento da parafina em temperatura ambiente. Cortes histológicos de 7,0 µm foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (Leica) com a utilização de navalha de aço. A remoção da parafina ocorre por imersão das lâminas contendo os cortes histológicos em xilol, duas lavagens por 10 a 15 minutos cada, uma lavagem com xilol:etanol absoluto (1:1) por 5 minutos, etanol absoluto por 10 minutos, etanol:água tratada com DEPC (1:1) e duas lavagens com água tratada com DEPC por 5 minutos.

3.4.8 Teste de laranja de acridina

Para verificar a integridade do RNA algumas lâminas foram coradas com laranja de acridina, em ambiente livre de RNases. Foram adicionados 200 µL de Tampão acetato pH

2,1 (ácido acético glacial 0,2 M e o pH ajustado com HCl) nas lâminas de vidro contendo as secções por 5 minutos e posteriormente 100 µL do corante fluorescente laranja de acridina 0,05%. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida, no escuro. As secções foram lavadas com tampão Veronal - acetato pH 7,8 até retirar todo o excesso do corante. As lâminas foram montadas em tampão Veronal e examinadas no microscópio Axiophot (Zeiss) de epifluorescência sob luz ultravioleta emitida na faixa de 395 nm ou 510 nm e fotodocumentadas com câmara digital AxioCam MRc – Zeiss e as imagens capturadas com o software Axiovision 4.7 (Zeiss).

3.4.9 Hibridização in situ

Para a composição da solução de hibridização, 60 ng de tRNA de levedura (Gibco BRL) e 60 ng de cada sonda (senso e antisenso), após desnaturação a 80 °C por 5 minutos, foram adicionados à solução de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, formamida 50%, EDTA 1 mM pH 8,0, solução de Denhart 1x, Dextranulphate 10%). Foram adicionados 100 µL da solução de hibridização em cada lâmina contendo as secções e cobertas com Parafilm®. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por um período de 16 horas.

Na pós-hibridização as lâminas foram cuidadosamente retiradas e sucessivamente lavadas a 37 °C em uma série de soluções SSC 4x, SSC 2x, SSC 1x e SSC 0,5x, preparadas a partir de SSC 20x (NaCl 3 M; Citrato Trissódico.2H₂O 0,3M) por 30 minutos em cada etapa. Em seguida, foram lavadas em tampão de detecção 1 (NaCl 0,15 M; Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5) por 5 minutos e incubadas por 30 minutos em tampão de bloqueamento (*Blocking Reagent* - Roche). As secções foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por 5 minutos e incubadas com 100 µL do anticorpo *Anti-digoxigenina AP Fab fragments* (Roche) diluído 1:1000 em tampão de detecção 1, por 1 hora. Após duas lavagens seguidas, de 15 minutos com o tampão de detecção 1 e uma lavagem com o tampão de detecção 3 (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5; NaCl 0,1 M e MgCl₂ 0,05 M, pH 9,5) por 5 minutos, as secções foram incubadas com a solução de coloração contendo 4,5 µL de NBT (nitro-blue tetrazolium chloride 0,05 g/mL) e 4,5 µL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 0,05 g/mL) em 1 mL de tampão de detecção 3. O tempo de coloração pode variar e a sonda controle senso é utilizada como comparação na hora de parar a reação de coloração. Para interromper a reação de coloração, as lâminas foram incubadas em tampão de detecção 4 (Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, contendo 1 mM EDTA), por 10 minutos. As lâminas foram montadas em glicerol 50% e examinadas no

microscópio de luz Axiophot (Zeiss) e fotodocumentadas com câmera digital AxioCam MRc – Zeiss e as imagens capturadas com o software Axiovision 4.7 (Zeiss). A evidência da hibridização é dada pela coloração azul-púrpura no local onde ocorreu.

3.5 Extração de DNA genômico

DNA genômico foi extraído de folhas jovens de *B. brizantha* utilizando o método DELLAPORTA et al., (1983), com modificações realizadas por LEBLANC et al., (1997).

Cerca de 2,0 gramas de folhas jovens de *B. brizantha* foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Foram adicionados 15 mL de tampão de extração Dellaporta pré-aquecido a 65 °C (SDS 20%; NaCl 5 M; 2-β-mercaptoetanol 1%; EDTA 50 mM; Tris-HCl 100 mM pH 7,5; PVP 1%). Após homogeneização por inversão dos tubos, as amostras foram incubadas a 65 °C por 60 minutos e posteriormente colocadas no gelo por 5 minutos. Foram adicionados 4 mL de acetato de potássio 5 M. As amostras foram homogeneizadas, deixadas no gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, aos quais foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado e incubado por 1 hora a -20°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 700 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 50 mM) e foi adicionado 3,5 µL de RNase (10 mg/mL) e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos para a completa ressuspensão do DNA e digestão do RNA. Para a desproteinização, adicionaram-se às amostras 700 µL de fenol: clorofórmio (1:1). Os tubos foram invertidos, cuidadosamente, por 10 minutos e, depois, centrifugados a 13.000 rpm para separação das fases. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos de microcentrífuga e para precipitar o DNA foram adicionados 35 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto. Os tubos foram invertidos e centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente. O DNA genômico foi ressuspensionado em 250 µL de tampão TE. O DNA foi armazenado a -20 °C.

O DNA genômico de *A. thaliana* foi extraído utilizando o método descrito por EDWARDS et al. (1991). Folhas jovens foram maceradas em tubo de microcentrífuga contendo 400 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM e SDS 0,5%) em temperatura ambiente. As amostras homogeneizadas em agitador de

tubos do tipo vortex foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 min. O sobrenadante de aproximadamente 350 μ L foi transferido para tubos novos onde foi adicionado e homogeneizado o mesmo volume de isopropanol gelado e incubado por 5 min a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco em temperatura ambiente. O DNA genômico foi ressuspenso em 50 μ L de água destilada. O DNA foi armazenado a 4 °C.

Após extração do DNA genômico, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDropTechnologies). Além disso, os DNAs extraídos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (80 V), corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL, para verificar a integridade e qualidade das bandas.

3.6 Construção da sonda para *Southern blot*

Foram utilizados como sonda no *Southern blot* os fragmentos obtidos usando os mesmos iniciadores da hibridização in situ, variando de 300 a 1.000 pb (Tabela 2), utilizando DNA genômico como molde para a amplificação. A reação de PCR foi feita com um volume final de 50 μ L, em solução contendo: 2 μ L de DNA; 50 mM MgSO₄; 2,5 mM dNTP; 10 μ M iniciadores (*Forward/Reverse*); 2,0 U de Taq High Fidelity Platinum (Invitrogen); 5 μ l de tampão 10X (Invitrogen). Uma reação sem o cDNA molde foi utilizada como controle negativo. O programa de amplificação utilizado foi de 95 °C por 2 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 56 °C por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 5 min, a 72 °C, em termociclador VeritiTM de 96 poços (Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e corados com brometo de etídio 0,5 μ g/mL.

O fragmento amplificado gerou uma banda que foi recortada do gel e os produtos foram purificados usando com o *kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up system* (Promega). A verificação da integridade e estimativa da concentração do produto foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,2% e corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL e tendo como referência o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder®* (Invitrogen). Além disso, a concentração do produto de PCR purificado foi também verificada em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDropTechnologiesTM).

3.6.1 Preparação da membrana de hibridização para *Southern Blot*

Amostras de 30 µg de DNA genômico de *B. brizantha* apomítica e sexual foram digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *XbaI* a 37 °C por aproximadamente 16 horas. As reações de digestão foram feitas em um volume final de 200 µL e após a digestão o DNA foi precipitado com 1/10 volumes de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto. As amostras foram submetidas à eletroforese, de duração de 4 horas, em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5%, corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL. Posteriormente, o gel foi tratado com solução de depuração (HCl 0,25 M) por 20 minutos, incubado com solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 30 minutos e em seguida tratado com a solução de neutralização (NaCl 1,5 M; Tris 0,5 M pH 7,5 e EDTA 0,5 M) por 30 minutos. Foi montado um sistema de transferência e o DNA foi transferido por capilaridade para a membrana de náilon Amersham HybondTM -N⁺ (GE Healthcare) em tampão salino de SSC 10X (Na3citrato.2H₂O 0,3 M pH 7,0 e NaCl 3 M), durante 18 horas. Após a desmontagem do sistema de transferência a membrana foi fixada por 2 horas, a 80 °C. Na pré-hibridização a membrana foi embebida em solução *ExpressHyb*® *Hybridization Solution* (Clontech Laboratories, Inc) e deixada a 60 °C por 5 horas em rotação.

3.6.2 *Southern blot*

Para a síntese da sonda marcada com $\alpha^{32}\text{P}$, foram utilizados 40 ng do produto do PCR contendo o fragmento previamente purificado. A síntese da sonda foi feita utilizando o *Kit Amersham*® *Ready-To-Go DNA Labelling Beads* (-dCTP) (GE Healthcare). A sonda foi marcada após desnaturação a 95 °C por 5 minutos e foram adicionados 5 µL de dCTP marcado com $\alpha^{32}\text{P}$, o sistema foi homogeneizado e incubado a 37 °C por 30 minutos. A sonda marcada foi posteriormente incorporada à solução de pré-hibridização, sendo incubada a 60 °C, sob baixa rotação. Após 20 horas de hibridização a membrana foi lavada duas vezes com SSC 2X/ SDS 0,1% por 30 minutos, uma vez com SSC 0,2X/ SDS 0,1% e lavada mais uma vez com a solução SSC 0,1X/ SDS 0,1% por 15 minutos. Após cada lavagem, a quantidade de radioatividade remanescente na membrana foi verificada com contador Geiger, e assim averiguada a necessidade de outra lavagem. Posteriormente, a membrana foi colocada no cassete contendo Imaging Plate (IP), por 24 horas, e a imagem gerada no aparelho *phosphor imaging plate* FUJIFILM FLA-3000 SERIES, utilizando os programas Image Reader FLA-3000 series V1.8 e visualização da imagem pelo Multi Gauge V3.0.

3.7 Análises de sequências dos genes em estudo

Para verificar a similaridade das sequências gênicas em estudo, *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* identificadas em bibliotecas de RNA-Seq de ovários apomíticos e sexuais de *B. brizantha*, com outras sequências gênicas foi realizado BLAST (*Basic local alignment search tool*) (ALTSCHUL et al., 1990, 1997) no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). BLASTn and BLASTx foram utilizados para comparar nucleotídeos e sequências preditas de aminoácidos, respectivamente. As sequências que apresentaram maior porcentagem de similaridade foram utilizadas no alinhamento múltiplo de sequências usando o ClustalW2 (CHENNA et al., 2003), acessado pelo programa BioEdit versão 7.2.6. O *e*-value e a identidade acima de 80% foram usados para definir as sequências com maior similaridade. O banco de dados TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) foi também utilizado para análises comparativas entre as sequências dos genes em estudo e a planta modelo *A. thaliana*. As sequências genômicas de *BbrizGID1* de genótipos sexuais e apomíticos foram obtidas pesquisando bibliotecas genômicas que ainda estão em construção e montagem. A análise dos mapas de restrição foram realizadas utilizando o programa Webcutter 2.0.

3.8 Construção de vetores e transformação de *A. thaliana*

O gene completo de *A. thaliana AtGID1a* foi clonado e sequenciado utilizando os iniciadores 5'-ATGGCTGCGAGCGATGAA-3' e 3'-TTAACATTCCGCGTTTACAAAC-5'. A reação de PCR foi feita com um volume final de 25 µL, contendo: 1,5 µL de cDNA; 5 µL de tampão 5X GoTaq® Reaction Buffer (Promega); 2,5 mM dNTP; 10 mM iniciadores (*Forward/Reverse*); 0,2 µL (5u/µL) de GoTaq® DNA Polymerase (Promega). Uma reação sem o DNA molde foi utilizada como controle negativo. O programa de amplificação utilizado foi de 95 °C por 2 min, 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 5 min a 72 °C, em termociclador Mastercycler Eppendorf Nexus GSX1. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (80 V), corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL. A purificação do gene completo amplificado foi realizada através do protocolo de extração do gel utilizando o *kit T-Pro Biotechnology*.

Para a inserção do gene nos vetores utilizou-se o sistema Gateway® (Invitrogen), através das reações de recombinação BP e LR. A tecnologia Gateway é um sistema universal

de clonagem e subclonagem de sequências de DNA, genes provenientes da amplificação de PCR são inseridos em um vetor de entrada, que então é usado para transferir o gene de interesse para um vetor de expressão. Uma vez inseridas neste sistema as sequências de DNA podem ser facilmente transferidas entre diferentes vetores utilizando locais específicos de recombinação. A reação de recombinação BP, que envolve sítios de recombinação específicas *attB* e *attP*, foi realizada utilizando 100 ng do produto de PCR purificado, 150 ng/μL do vetor de entrada pDONRTM (NOB 216) e 5x BP clonase reaction buffer, para uma reação de volume final de 10 μL. A reação de recombinação BP ocorreu por 16 horas a 25 °C e posteriormente, foi adicionado 1 μL de Proteinase K. A reação foi incubada a 37 °C por 10 min e armazenada a -20 °C. A reação BP foi transformada utilizando células competentes de *E. coli DHα* e por eletroporação. Para a transformação foi usado 4 μL da reação BP em 50 μL de células competentes. As colônias isoladas foram selecionadas e a confirmação da transformação foi realizada por reação de PCR. A minipreparação do DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit *T-Pro Biotechnology*. Os vetores obtidos foram sequenciados para verificar se a amplificação e a clonagem do gene foram realizadas corretamente.

A reação LR, que envolve a recombinação entre os sítios específicos *attL* e *attR*, ou seja, entre os vetores de entrada e o vetor de destino, foi realizada para a obtenção das construções *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a*. Para a reação LR utilizou-se 300 ng do vetor de entrada contendo o gene, 150 ng/μL do vetor de destino pDONRTM (NOB 916_pSTK e NOB 1161_p35S) (Figura 9) e 5x LR clonase reaction buffer, para uma reação de volume final de 10 μL. A reação de recombinação ocorreu por 16 horas a 25 °C. Posteriormente, foi adicionado 1 μL de Proteinase K. A reação foi incubada a 37 °C por 10 minutos e armazenada a -20 °C.

As construções *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a* foram inseridas em cepas competentes de *A. tumefaciens*. Foi adicionado 1 μg de plasmídio purificado a 100 μL de *A. tumefaciens*, a mistura foi homogeneizada suavemente e incubada no gelo por 30 minutos. A transformação foi realizada por eletroporação a 1500 V. Após a transformação, cerca de 350 μL de meio líquido LB foi adicionado à cubeta de eletroporação. As células transformadas (1 mL) foram plaqueadas em meio LB ágar contendo o antibiótico espectinomicina (100 μg/mL), em que os plasmídeos possuem resistência, e o antibiótico rifomicina (100 μg/mL), em que a *A. tumefaciens* apresenta resistência. As placas foram incubadas a 28 °C por dois dias, para o aparecimento das colônias.

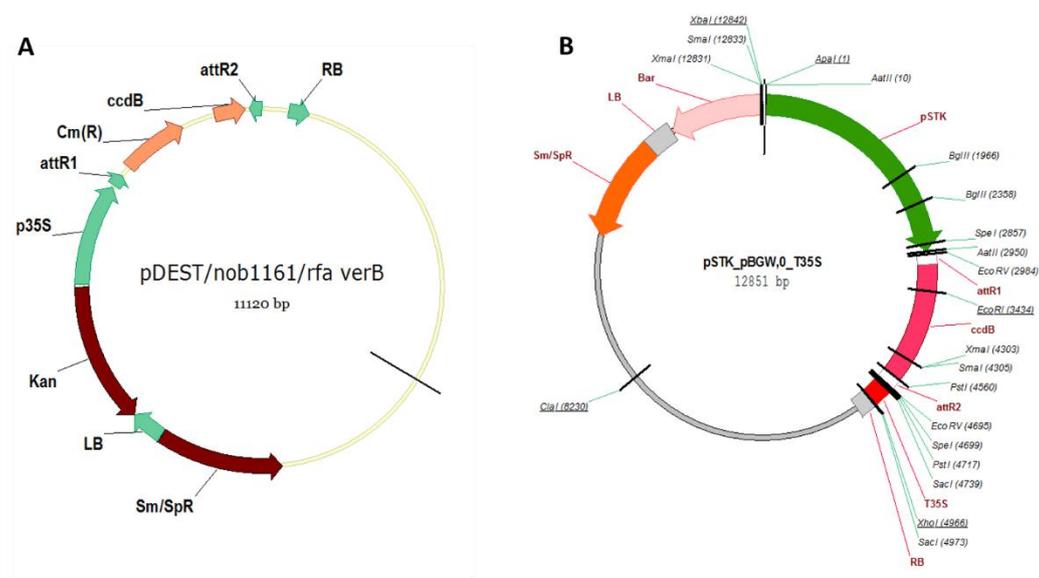


Figura 9. Esquema dos vetores contendo o promotor constitutivo 35S (A) e do vetor contendo o promotor SEEDSTICK que possui expressão específica no óvulo (B), utilizados como vetores de destino para a superexpressão de *AtGID1a*, com as construções *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a*, respectivamente.

Plantas de *A. thaliana* do ecótipo Columbia foram transformadas pelo método floral dip (CLOUGH, S.; BENT, 1998). Inicialmente, as diferentes culturas de *A. tumefaciens* contendo os clones de interesse foram inoculadas em 400 mL de meio líquido LB suplementado com os antibióticos rifampicina (100 µg/mL), gentamicina (100 µg/mL) e espectinomicina (100 µg/mL), e foram incubadas a 28 °C, com agitação a 150 rpm. Após 24 horas de incubação, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 15 min, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 250 mL de meio de infiltração (sacarose 5% e Silwet L-77 0,02%). As flores de *A. thaliana* foram mergulhadas na solução de infiltração contendo as células de *A. tumefaciens* durante cerca de 30 segundos por três vezes. E, após desenvolvimento e maturação das sementes, estas foram coletadas e armazenadas a 4 °C.

As linhagens transformantes foram selecionadas utilizando os agentes seletivos fosfotricina (PPT, princípio ativo do herbicida Basta) na concentração estoque de 120 mg/mL (diluição 1:1.000 em água, com adição de 500 µL de Silwet-77/1000 mL) para as plantas transformadas com a construção *pSTK::AtGID1a* e o antibiótico canamicina na concentração de 100 µg/L, para os transformantes com *p35S::AtGID1a* (Figura 10). A análise

fenotípica das plantas transgênicas foi realizada para identificar possíveis diferenças na formação e desenvolvimento dos órgãos reprodutivos.

As plantas transgênicas de *A. thaliana* *pKNU:nlsYFP* (TUCKER et al., 2012) também foram transformadas pelo método floral dip (CLOUGH, S.; BENT, 1998) com a construção *p35S::AtGID1a*. As linhagens transformantes foram selecionadas usando canamicina.

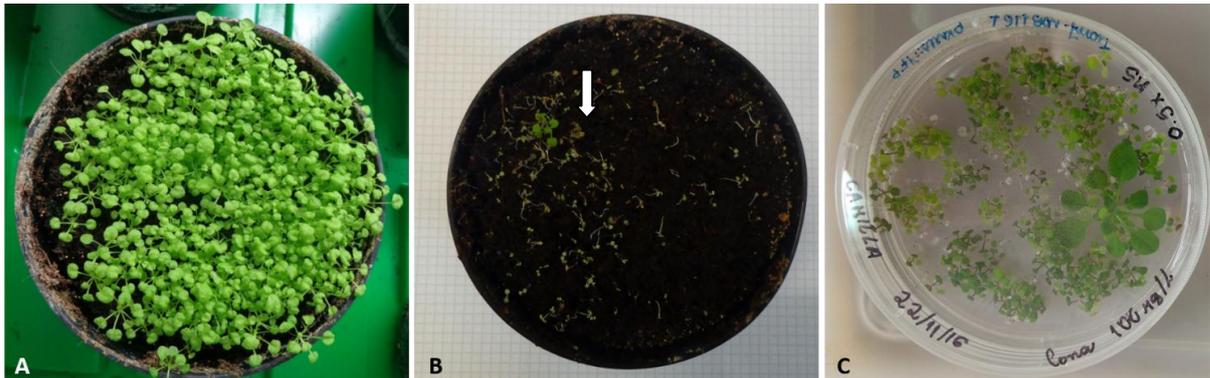


Figura 10. Seleção de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. **A** - Plantas de *A. thaliana* em vasos sem agentes seletivos e **B** - plantas transformadas com a construção *pSTK::AtGID1a* em vasos contendo o agente seletivo fosfotricina (PPT) aplicado diretamente no solo apresentando uma planta resistente (seta). **C** - Plantas transformadas com a construção *p35S::AtGID1a* selecionadas em placa de Petri contendo canamicina 100 µg/L.

3.9 Análise morfológica dos óvulos de *A. thaliana*

As inflorescências das plantas transformadas, selvagens e mutantes em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletadas, fixadas em etanol:ácido acético (9:1) durante 24 horas e posteriormente lavadas com etanol 90% por 10 minutos e em seguida lavadas com etanol 70%. As amostras foram armazenadas a 4 °C. Para a análise e visualização dos óvulos foi realizado clareamento utilizando solução de cloral hidratado:glicerol:água (3:1:2). Após 24 horas das amostras embebidas pela solução de clareamento, as inflorescências foram dissecadas usando o estereomicroscópio, para a retirada dos pistilos em diferentes estádios do desenvolvimento, colocados em lâmina com solução de clareamento e coberto com lamínula para ser observado utilizando o microscópio ótico Zeiss Axiophot D com microscopia de contraste diferencial de fase. As imagens foram capturadas em uma câmera Axiocam MRC5 (Zeiss) usando o programa Axiovision (versão 4.1). Foram analisados três eventos independentes de cada linhagem transformada *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a*, três eventos independentes do mutante *ipt9*, três eventos independentes da segunda geração da linhagem transgênica *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a* e três diferentes plantas da linhagem selvagem (ecótipo Columbia).

A linhagem *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a* foi analisada em microscópio Zeiss Axiophot usando um filtro de laser com o comprimento de 475-540 nm para excitação. As emissões foram detectadas entre 530-540 nm. As imagens foram capturadas em uma câmera AxioCam MRc5 (Zeiss) usando o programa Axiovision (versão 4.1).

3.9.1 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

As inflorescências de *A. thaliana*, das linhagens transgênicas e selvagens, foram coletadas em solução fixadora contendo paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4 1M pH 7,2) e submetidas a vácuo por 30 minutos. As amostras foram lavadas duas vezes com o tampão fosfato de sódio e posteriormente desidratadas com série de etanol até 70%, e posteriormente, as amostras foram armazenadas a 4 °C.

Os óvulos dissecados foram montados em lâminas utilizando o protocolo de coloração com Feulgen (BRASELTON et al., 1996) e observados em microscópio confocal de varredura a laser Leica SP5 com o laser de íon de argônio com o comprimento de 488 nm para excitação da fluorescência GFP, usado para verificar a fluorescência do corante. As emissões foram detectadas entre 505-580 nm. As imagens foram coletadas no modo multicanal e as sobreposições foram geradas usando o software de análise LEICA LAS AF 2.2.0.

3.10 Análise de expressão de GUS

As linhagens transgênicas *pAtGID1a::AtGID1a-GUS*, *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* e *pAtGID1c::AtGID1c-GUS* (SUZUKI et al., 2009; GALLEGO-GIRALDO et al., 2014), foram analisadas em diferentes estádios do desenvolvimento do óvulo. Inicialmente, estas plantas foram submetidas à reação de PCR para confirmar a presença da marcação com β -Glucuronidase (GUS), para isto foi realizada extração do DNA (EDWARDS et al., 1991) e a reação de PCR foi feita com um volume final de 15 μL , em solução contendo: 2,5 μL de DNA; 25 mM MgSO_4 ; 5 mM dNTP; 10 μM iniciadores (5'-GTGCACCATCAGCACGTTATC-3' e 3'-GAGCATCAGGGCGGCTATAC-5'); 2,0 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 3 μl de tampão 10X. Uma reação sem o DNA molde foi utilizada como controle negativo. O programa de amplificação utilizado foi de 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 40 segundos e uma extensão final de 5 min, a 72 °C, em termociclador. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

As reações de GUS foram realizadas como previamente descrito por LILJEGREN et al., (2000). As inflorescências foram coletadas em acetona 90% e incubadas a 4 °C por 1 hora. Posteriormente a acetona foi removida e as inflorescências lavadas três vezes com o tampão fosfato de sódio (NaPi 1M pH 7,2), sendo em seguida adicionado o GUS *Staining Buffer* a 37 °C no escuro. O tempo de permanência no tampão GUS foi avaliado por observações da coloração em estereomicroscópio. A observação da coloração das inflorescências variou entre 18 a 24 horas. Após a coloração, as inflorescências foram submetidas a uma série de lavagens com etanol 30%, 50% e 70%, e colocadas em solução de clareamento para a observação em microscópio ótico Zeiss Axiophot.

4 RESULTADOS

4.1 Análise das sequências dos genes de expressão diferencial associados ao metabolismo de fitormônios

Análise das bibliotecas de RNA-Seq de ovários de *B. brizantha* sexual e apomítica em estádios de megasporogênese e megagametogênese revelou genes diferencialmente expressos entre os dois estádios de desenvolvimento ou modos de reprodução. Entre eles há genes associados à via de biossíntese e ativação dos fitormônios como *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* estudados nesta tese. No banco de RNA-Seq o transcrito de *BbrizGID1* era composto por 606 nucleotídeos, de *BbrizIPT9* por 903 nucleotídeos e de *BbrizLOG* por 621 nucleotídeos.

O sequenciamento genômico de *B. brizantha* de plantas sexuais e apomíticas foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2500 *Pair-ends*. Foi feito através do sequenciamento de *shotgun* e aproximadamente 330 milhões de reads de 150 pb foram utilizadas, equivalente a 49,5 bilhões de pb, constituindo uma cobertura de 80 vezes. O genoma foi montado usando Masurca v.3.1.3. Foram gerados 532.012 contigs para a biblioteca de plantas sexuais e 186.887 contigs para a biblioteca de plantas apomíticas de *B. brizantha* (Irsigler, informação pessoal). Neste trabalho, o genoma de *B. brizantha* de plantas sexuais e apomíticas foi utilizado para a obtenção dos *full-lengths* das sequências dos genes *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG*.

Nas bibliotecas genômicas de *B. brizantha* sexual e apomítica a sequência *full-length* de DNA de *BbrizGID1* apresentou 1.646 nucleotídeos, formada por dois éxons e um íntron (Apêndice A). Este gene está presente em ambas as bibliotecas genômicas, possuindo o mesmo número de aminoácidos, diferindo em suas sequências em apenas três aminoácidos nas posições 12, 152 e 217. Na posição 12, uma lisina (K) encontrada em plantas sexuais é substituída por uma treonina (T) em plantas apomíticas. Na posição 152, uma isoleucina (I) encontrada em plantas sexuais foi substituída pela valina (V) em plantas apomíticas. Na posição 217, uma lisina (K) de sexuais é substituída por arginina (R) em apomíticos (Figura 11).

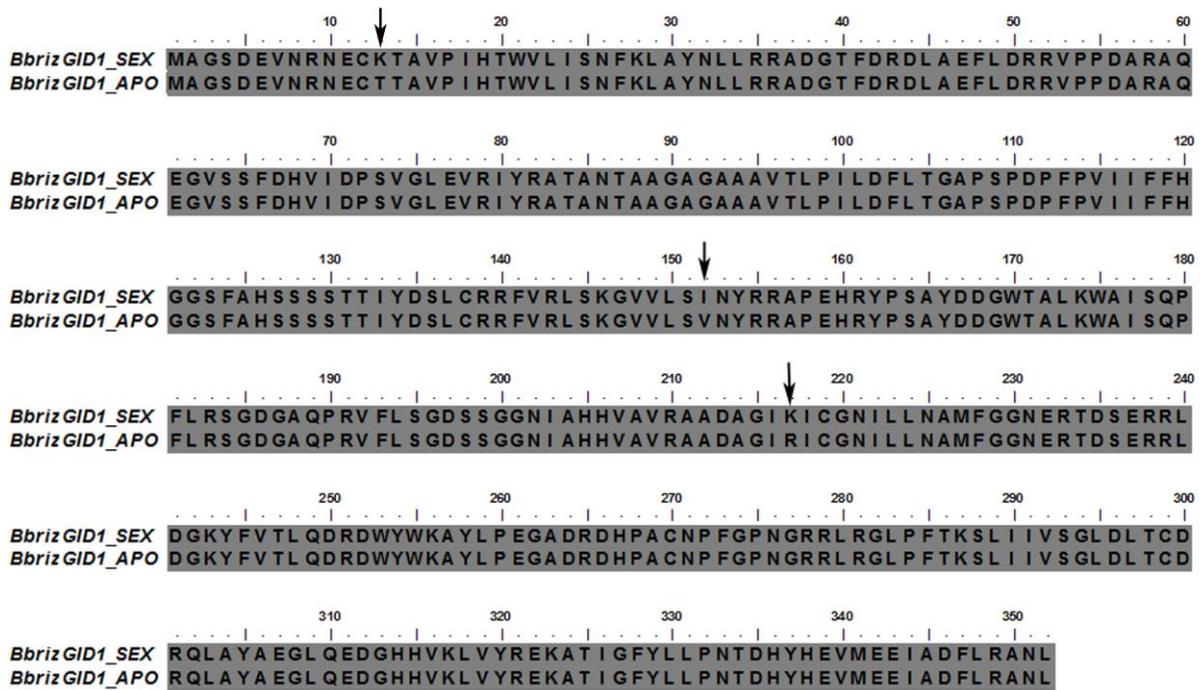


Figura 11. Comparação das seqüências previstas de aminoácidos de *BbrizGID1* de plantas apomíticas (APO) e sexuais (SEX). Na posição 12, uma lisina (K) encontrada em plantas sexuais é substituída por uma treonina (T) em plantas apomíticas. Na posição 152, uma isoleucina (I) encontrada em plantas sexuais é substituída por uma valina (V) em plantas apomíticas. Na posição 217, uma lisina (K) de sexuais é substituída por uma arginina (R) em apomíticos (setas). O programa ClustalW foi usado para o alinhamento.

Pesquisa na base de dados NCBI revelou que o transcrito de *BbrizGID1* apresentou maior similaridade com as sequências dos receptores de giberelina *GID1-like* de outras plantas da família Poaceae (Figura 12). As sequências mais similares foram encontradas com as seguintes espécies (porcentagem de identidade): *Setaria italica* (92%), *Sorghum bicolor* (91%), *Saccharum officinarum* (90%), *Zea mays* (87%), *Brachypodium distachyon* (86%), *Oryza sativa* Japonica Group (84%), *Hordeum vulgare* (83%). Em comparação com as sequências proteicas dos três genes da família *AtGID1* de *A. thaliana*, a similaridade de *BbrizGID1* com os três genes foram muito próximas: *AtGID1c* (58%), *AtGID1a* (57%) e *AtGID1b* (55%). Ueguchi-Tanaka et al. (2005) identificaram que o gene *OsGID1* em arroz codifica uma proteína com similaridade ao HSL e o alinhamento de *BbrizGID1* também mostrou regiões conservadas com a sequência consenso da família HSL, incluindo os motivos HGG e GX SXG. Além disso, mostrou dois centros catalíticos conservados com a sequência proteica de HSL, serina (S) e ácido aspártico (D), enquanto outro centro catalítico, histidina (H), foi substituído por isoleucina (I) (Figura 13). Também foram identificados dois resíduos de aminoácidos conservados entre os genes *GID1-like*, glicina (G) e arginina (R), que são essenciais para manter a atividade de ligação do receptor a giberelina em arroz (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005).

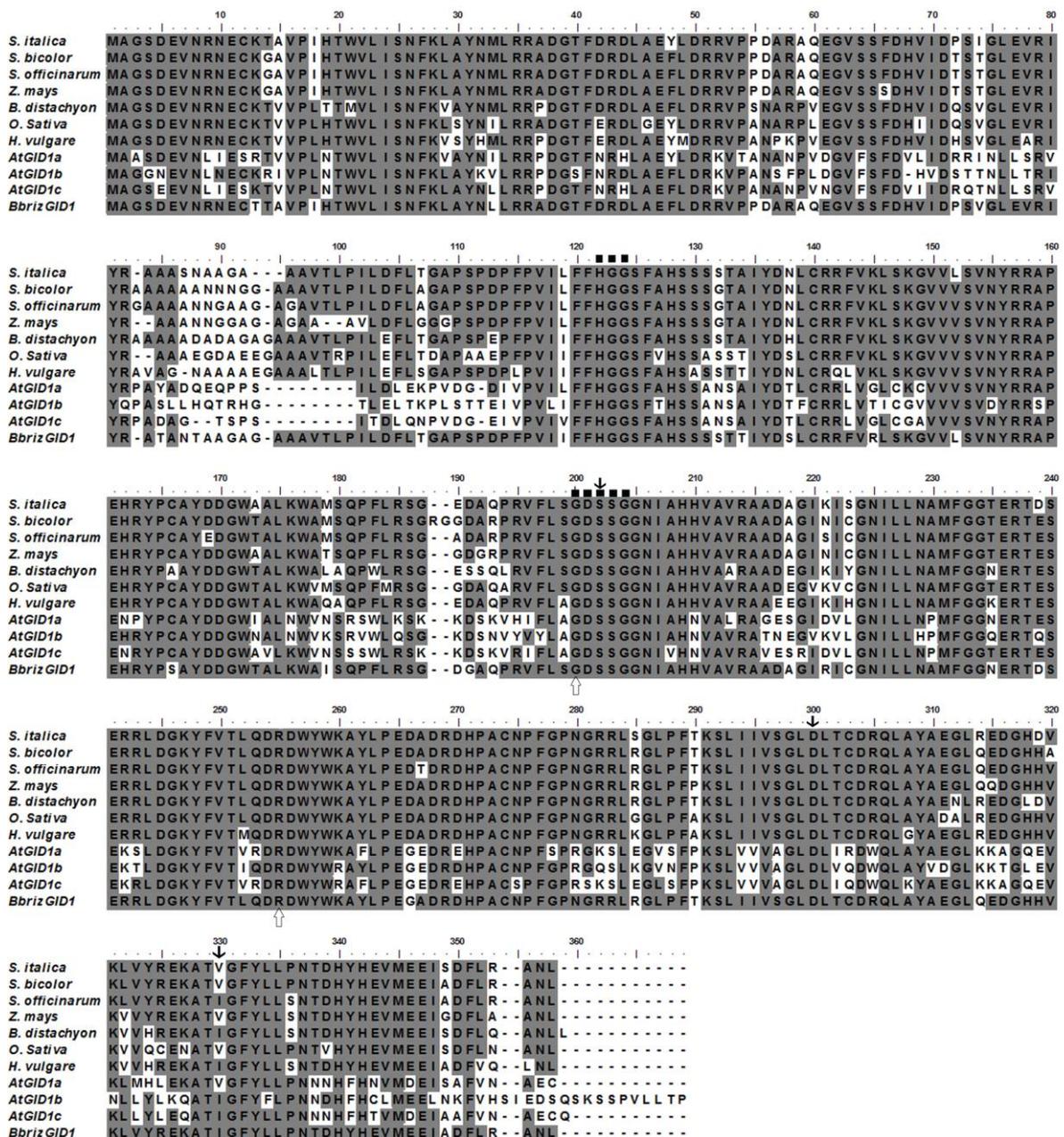


Figura 12. Alinhamento múltiplo da sequência de *BbrizGID1* e as sequências mais similares encontradas no banco de dados NCBI: *Setaria italica* (Número de acesso XP_004962116.1), *Sorghum Bicolor* (CAP64329.1), *Saccharum officinarum* (CAP64326.1), *Zea mays* (CAP64327.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003568469.1), *Oryza sativa* japonica group (XP_015639961.1), *Hordeum vulgare* (CAO98733.1), *AtGID1a* (At3g05120), *AtGID1b* (At3g63010) e *AtGID1c* (At5g27320). Resíduos de aminoácidos idênticos são marcados em cinza. Os quadrados identificam os motivos HGG e GX SXG, regiões conservadas com a família homônio sensitive lipase (HSL). As setas pretas mostram os três centros catalíticos, serina (S), ácido aspártico (D) e isoleucina (I), este último substitui a histidina (H), característica da família HSL. As setas brancas indicam dois resíduos de aminoácidos conservados, glicina (G) e arginina (R), que são essenciais para manter a atividade de ligação do receptor a giberelina em arroz (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005). O programa ClustalW foi usado para o alinhamento múltiplo.

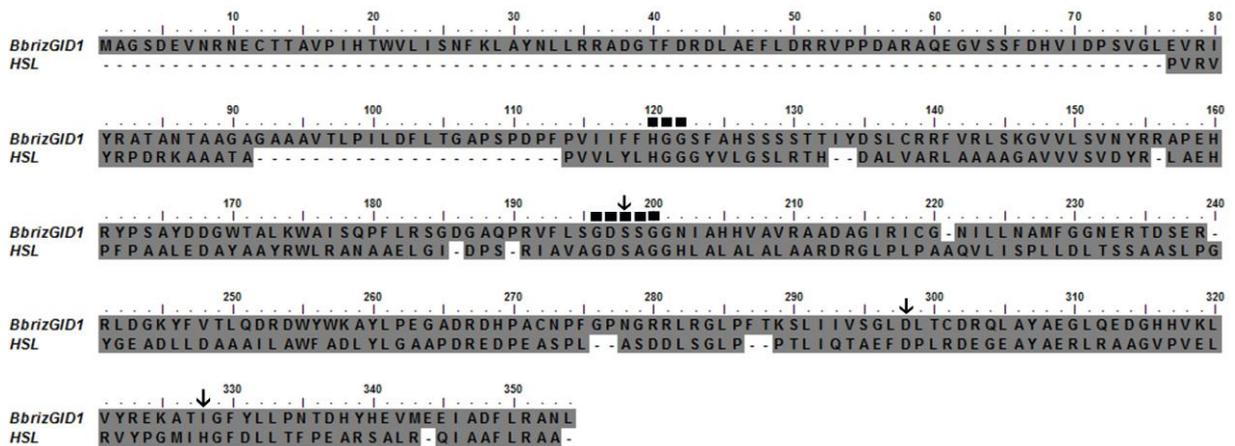


Figura 13. Alinhamento da sequência de aminoácidos de *BbrizGID1* de plantas apomíticas e a sequência consenso da família hormônio sensitive lipase (HSL). Os quadrados representam motivos HSL conservados, HGG e GXSXG. As setas pretas mostram os três centros catalíticos, serina (S), ácido aspártico (D) e histidina (H) da HSL, enquanto o terceiro aminoácido foi substituído por isoleucina (I) nas plantas de *Brachiaria brizantha*. O programa ClustalW foi usado para o alinhamento das sequências.

Nas bibliotecas genômicas de *B. brizantha* sexual e apomítica a sequência *full-length* de DNA de *BbrizIPT9* apresentou 1.356 nucleotídeos (Apêndice B). Este gene está presente em ambas bibliotecas genômicas, que codificam 451 aminoácidos que são idênticos entre os genótipos apomíticos e sexuais de *B. brizantha*, e não foram detectados a presença de íntrons (Figura 14).

Análise do transcrito de *BbrizIPT9* por BLAST na base de dados NCBI revelou maior similaridade deste gene com as proteínas *isopentenyltransferase 9* da família Poaceae, nas seguintes porcentagens de similaridade (Figura 15): *Setaria italica* (90%), *Sorghum bicolor* (80%), *Zea mays* (77%), *Saccharum hybrid cultivar R570* (75%), *Brachypodium distachyon* (73%), *Oryza sativa Japonica Group* (73%), *Oryza brachyantha* (71%), *Aegilops tauschii* (70%) e *Hordeum vulgare* (69%). Em comparação com as sequências proteicas dos nove genes da família *IPT* de *A. thaliana*, *BbrizIPT9* apresentou maior similaridade com o *AtIPT9* (53%). O NCBI *Conserved Domain Search* indicou que *BbrizIPT9* compartilha uma sequência conservada comum com a família *IPP transferase* (tRNA delta(2)-*isopentenylpyrophosphate transferase*).

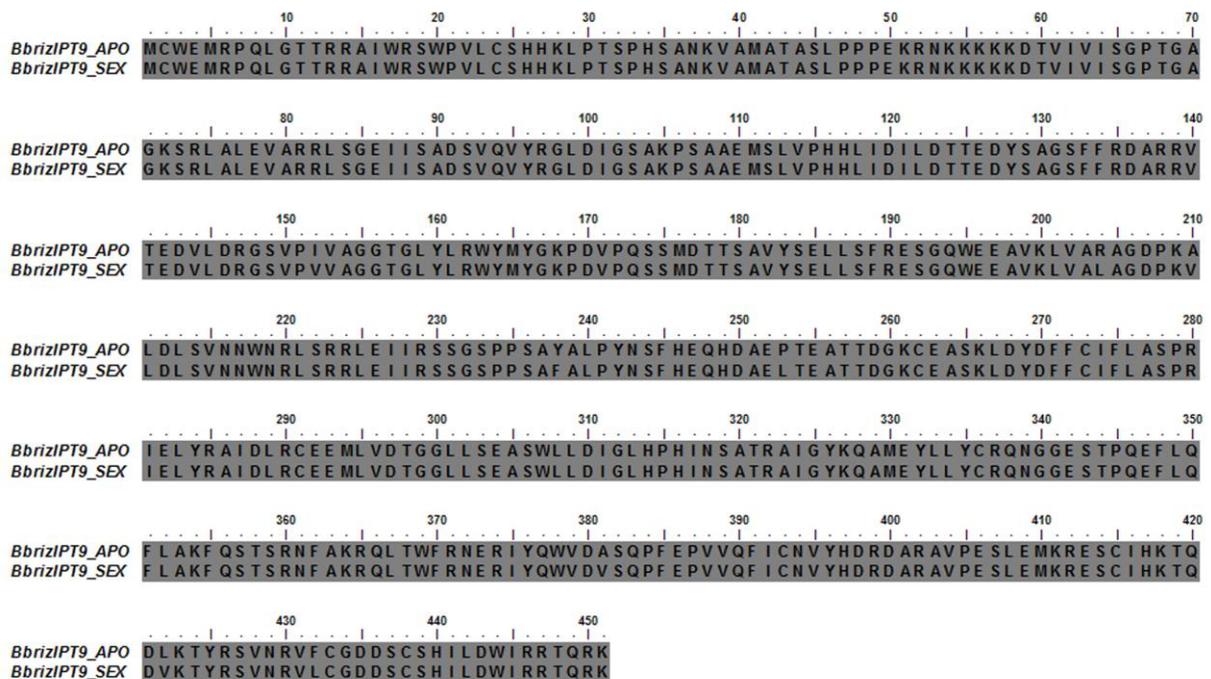


Figura 14. Comparação das sequências previstas de aminoácidos de *BbrizIPT9* de plantas apomíticas (APO) e sexuais (SEX). A sequência dos genes obtidos no banco de dados genômicos não mostrou diferença entre nucleotídeos e aminoácidos, apresentando uma sequência idêntica entre os genótipos de plantas apomíticas e sexuais. O programa ClustalW foi usado para o alinhamento.

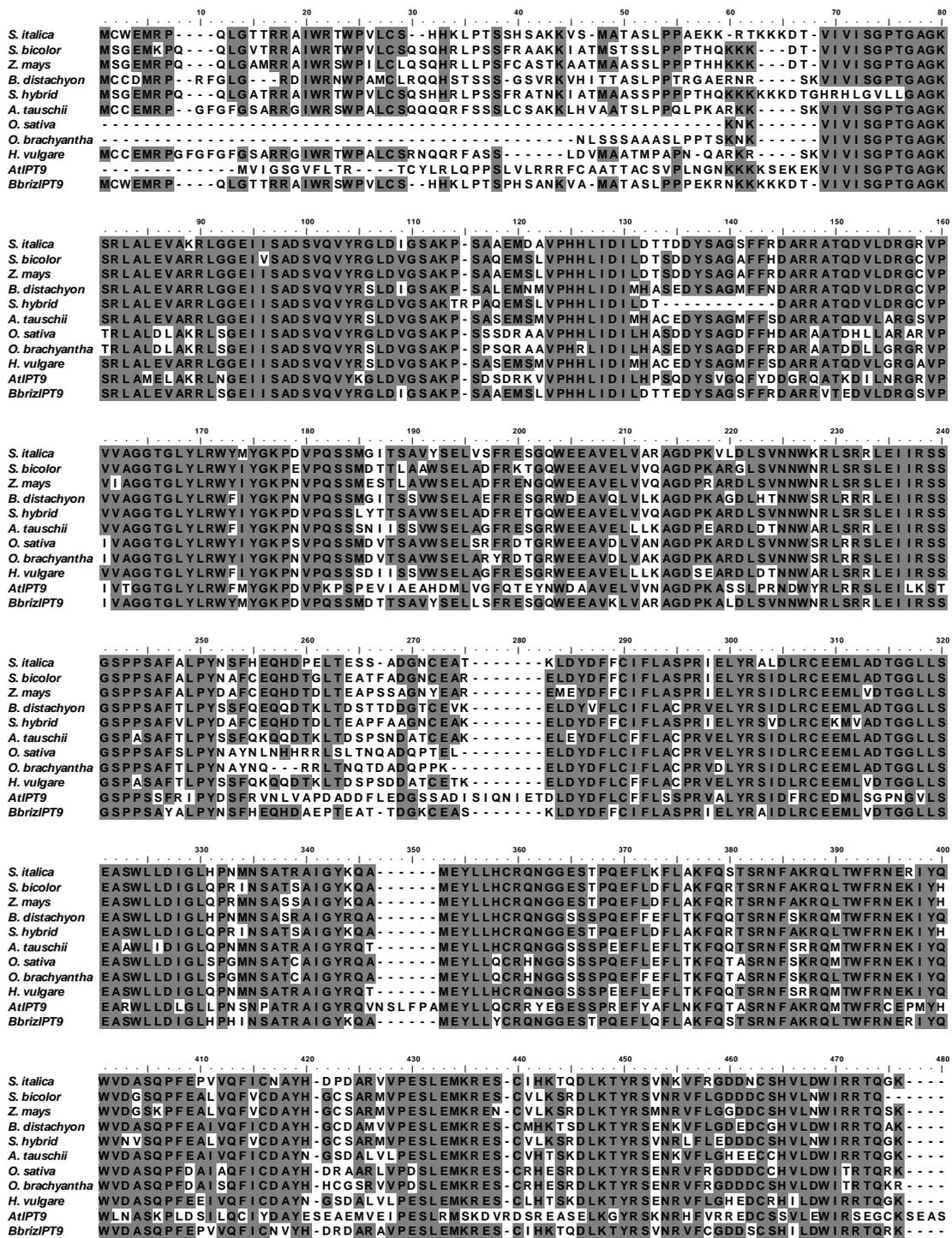


Figura 15. Alinhamento múltiplo de *BbrizIPT9* e as sequências similares encontradas no banco de dados NCBI: *Setaria italica* (XP_004963310.1), *Sorghum bicolor* (XP_002463348.1), *Zea mays* (AQK80671.1), *Saccharum hybrid* cultivar R570 (AGT16524.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003563223.2), *Oryza sativa* japonica group (XP_015644187.1), *Oryza brachyantha* (XP_006656524.1), *Aegilops tauschii* (XP_020163508.1) e *Hordeum vulgare* (BAJ89736.1). Resíduos de aminácidos idênticos são marcados em cinza. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o programa ClustalW.

Nas bibliotecas genômicas de *B. brizantha* sexual e apomítica a sequência *full-length* de DNA de *BbrizLOG*, constituída por sete éxons e seis íntrons, apresentou 3.492 nucleotídeos na biblioteca genômica de plantas apomíticas, e 3.957 nucleotídeos foram detectados na biblioteca genômica de plantas sexuais (Apêndice C). Este gene está presente em ambas às bibliotecas genômicas, que codificam 206 aminoácidos que são idênticos entre os genótipos de *B. brizantha*, apomítica e sexual (Figura 16).

A pesquisa no banco de dados NCBI e o alinhamento do transcrito de *BbrizLOG* mostrou alta similaridade com sequências protéicas de plantas da família Poaceae e regiões conservadas (Figura 17): *Setaria itálica* (100%), *Dichanthelium oligosanthos* (99%), *Panicum hallii* (99%), *Sorghum bicolor* (99%), *Oryza sativa* Japonica Group (97%), *Zea mays* (98%), *Oryza brachyantha* (95%) e *Brachypodium distachyon* (94%). A similaridade de *BbrizLOG* com as sequências proteicas dos nove genes da família *LOG* de *A. thaliana* foram muito próximas, sendo a maior similaridade encontrada com a família de proteínas lisina descarboxilase *AtLOG4* (80%), *AtLOG3* (80%) e *AtLOG1* (79%). O gene *AtLOG3* possui uma sequência adicional de 24 aminoácidos, não observada em outros genes da família Poaceae e nos *AtLOGs* de *A. thaliana*. O NCBI *Conserved Domain Search* indicou que *BbrizLOG* compartilha uma sequência altamente conservada comum com a família *lysine decarboxylase*. Como os membros desta família gênica compartilham um motivo altamente conservado PGGXGTXXE, este motivo é apontado como provavelmente importante para a funcionalidade do gene.

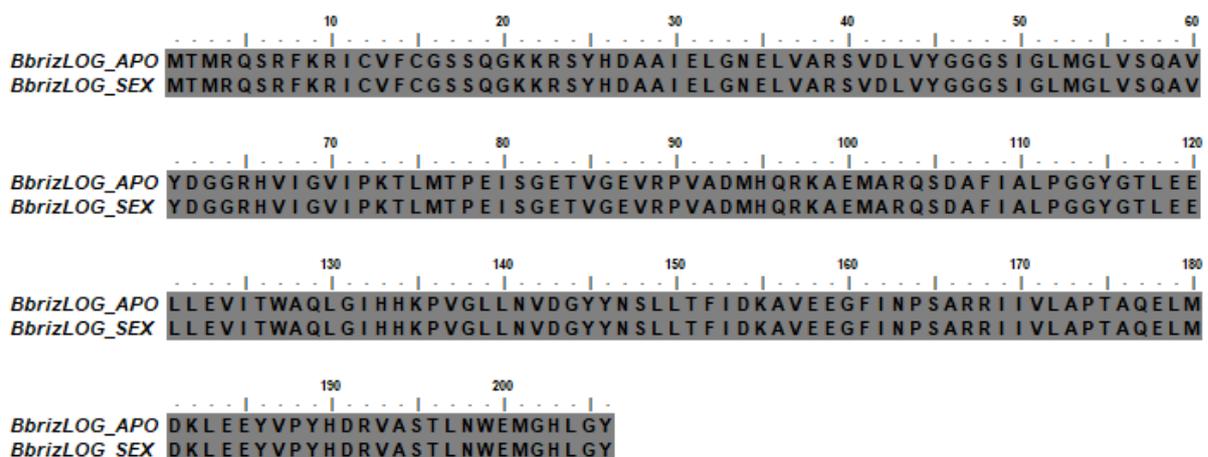


Figura 16. Comparação das sequências previstas de aminoácidos de *BbrizLOG* de plantas apomíticas (APO) e sexuais (SEX). A sequência dos genes obtidos no banco de dados genômicos não mostrou diferença entre os 206 aminoácidos entre os genótipos de plantas apomíticas e sexuais. O programa ClustalW foi usado para o alinhamento.

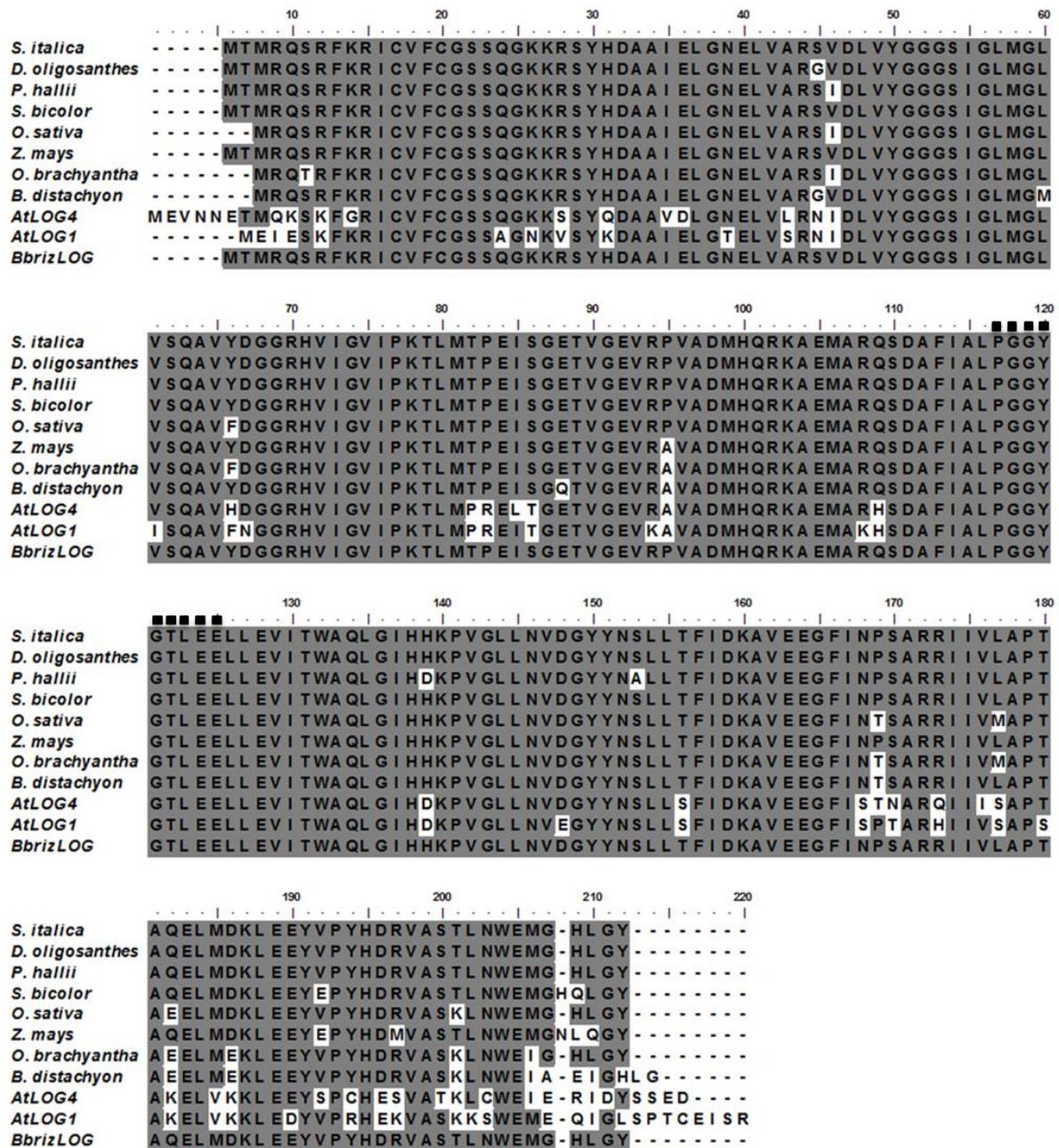


Figura 17. Alinhamento múltiplo das seqüências de *BbrizLOG* com as seqüências mais semelhantes encontradas no banco de dados NCBI e no banco de dados TAIR: *Setaria italica* (Número de acesso XP_004982851.1), *Dichantheium oligosanthos* (OEL17164.1), *Panicum hallii* (PAN46850.1), *Sorghum Bicolor* (XP_002467072.1), *Oryza sativa* japonica group (XP_015613334.1), *Zea mays* (NP_001169307.1), *Oryza brachyantha* (XP_006661863.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003574067), *AtLOG4* (AT3G53450) e *AtLOG1* (AT2G28305). Resíduos de aminácidos idênticos são marcados em cinza. Os quadrados indicam um motivo altamente conservado PGGXGTXXE entre as seqüências. O alinhamento múltiplo das seqüências foi realizado utilizando o ClustalW.

4.2 Detecção da presença dos genes em estudo nos genótipos de *B. brizantha* sexual e apomítico

O número de cópias de *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* foi estimado por análise de *Southern blot* utilizando DNA genômico das plantas apomíticas e sexuais (Figura 18). O mapa de restrição mostrou que o fragmento de *BbrizGID1* utilizado como sonda para o *Southern blot* não apresentou sítios de restrição interna para as enzimas utilizadas. Já o mapa de restrição do DNA genômico de ambos os genótipos mostrou que não há sítios de restrição para *EcoRI* e *XbaI* e um sítio foi encontrado para *HindIII* na região do íntron, na posição 444. O local de hibridização da sonda está entre as posições 1.334 e 1.633 da região do éxon da sequência de nucleotídeos. A hibridização genômica confirmou que *BbrizGID1* está presente tanto em genótipos sexuais quanto em apomíticos em um padrão de restrição diferente. Apresentou três fragmentos após a digestão com a enzima *EcoRI*, quatro após a digestão com *HindIII* e dois fragmentos após a digestão com *XbaI* em DNA genômico apomítico. No genótipo sexual, um fragmento foi hibridizado após a digestão *EcoRI*, três após *HindIII* e dois fragmentos após a digestão com *XbaI* (Figura 18). Portanto, a análise por *Southern Blot* mostrou um total de 2-4 bandas nas amostras do genótipo apomítico e 1-3 bandas no genótipo sexual.

A análise do mapa de restrição para o fragmento utilizado como sonda para *BbrizIPT9*, indicou um sítio de restrição interna para a enzima *HindIII*, apresentando sete bandas no genótipo de plantas apomíticas e três bandas em genótipos sexuais. Para as enzimas *EcoRI* e *XbaI* não foi encontrado sítio de restrição interna na sonda. A digestão com *EcoRI* apresentou quatro bandas para genótipos apomíticos e três bandas para sexuais, já *XbaI* apresentou três bandas para as plantas apomíticas e duas para plantas sexuais. Portanto, a análise por *Southern blot* mostrou um total de 3-4 bandas nas amostras do genótipo apomítico e 2-3 bandas no genótipo sexual, sugerindo que *BbrizIPT9* está presente em genótipos sexuais e apomíticos também apresentando três e quatro cópias, respectivamente (Figura 18).

A análise por *Southern blot* de *BbrizLOG* indicou que este gene está presente em apenas uma cópia no genoma de ambos genótipos, apomíticos e sexuais. A análise do mapa de restrição indicou que não há sítios de restrição interna no fragmento utilizado como sonda, e foi observada a presença de apenas uma banda para cada enzima de restrição utilizada na digestão, *EcoRI*, *HindIII* e *XbaI*, em ambos os genótipos, apomíticos e sexuais (Figura 18).

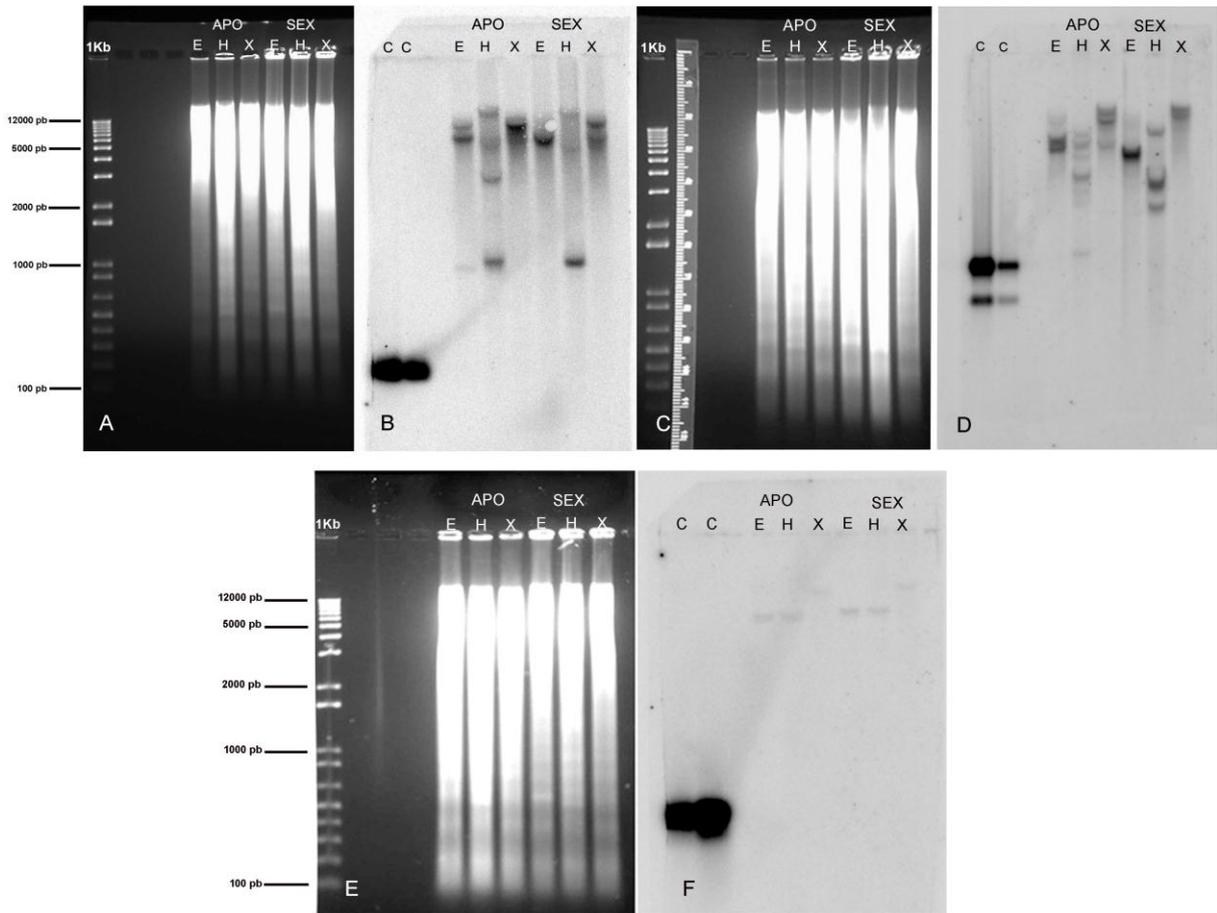


Figura 18. Análise do DNA genômico de *Brachiaria brizantha* apomítica (APO) e sexual (SEX) digerida com *EcoRI* (E); *HindIII* (H) e *XbaI* (X). Eletroforese em gel de agarose 0,8% (A, C e E) e fragmentos hibridizados por *Southern blot* de *BbrizGID1* (B), *BbrizIPT9* (D) e *BbrizLOG* (F), marcados com a sonda radioativa marcada com ^{32}P . A imagem foi gerada usando o *phosphor imaging plate*. C = controle, mesmo fragmento usado para sintetizar a sonda.

4.3 Expressão gênica determinada em ovários em diferentes estádios de desenvolvimento de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*

Para validar biologicamente genes diferencialmente expressos de *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* em ovários sexuais e apomíticos de *B. brizantha*, inicialmente, foram realizados experimentos de RT-qPCR nos mesmos estádios de desenvolvimento do banco de RNA-Seq, megasporogênese e megagametogênese.

Os resultados do RNA-Seq, validados por RT-qPCR, mostraram maior expressão de *BbrizGID1* em ovários de plantas apomíticas em relação aos ovários de plantas sexuais, sendo a maior expressão detectada no início da megasporogênese, estágio I (Figura 19). *BbrizIPT9* apresentou maior expressão nos ovários de plantas sexuais, tanto nos estádios de megasporogênese como na megagametogênese, também validados por RT-qPCR (Figura 19). *BbrizLOG* apresentou maior expressão em ovários de plantas apomíticas, nos estádios de megasporogênese e megagametogênese, quando comparada com a de plantas sexuais na análise de bibliotecas de RNA-Seq e o mesmo perfil de expressão foi observada por RT-qPCR (Figura 19).

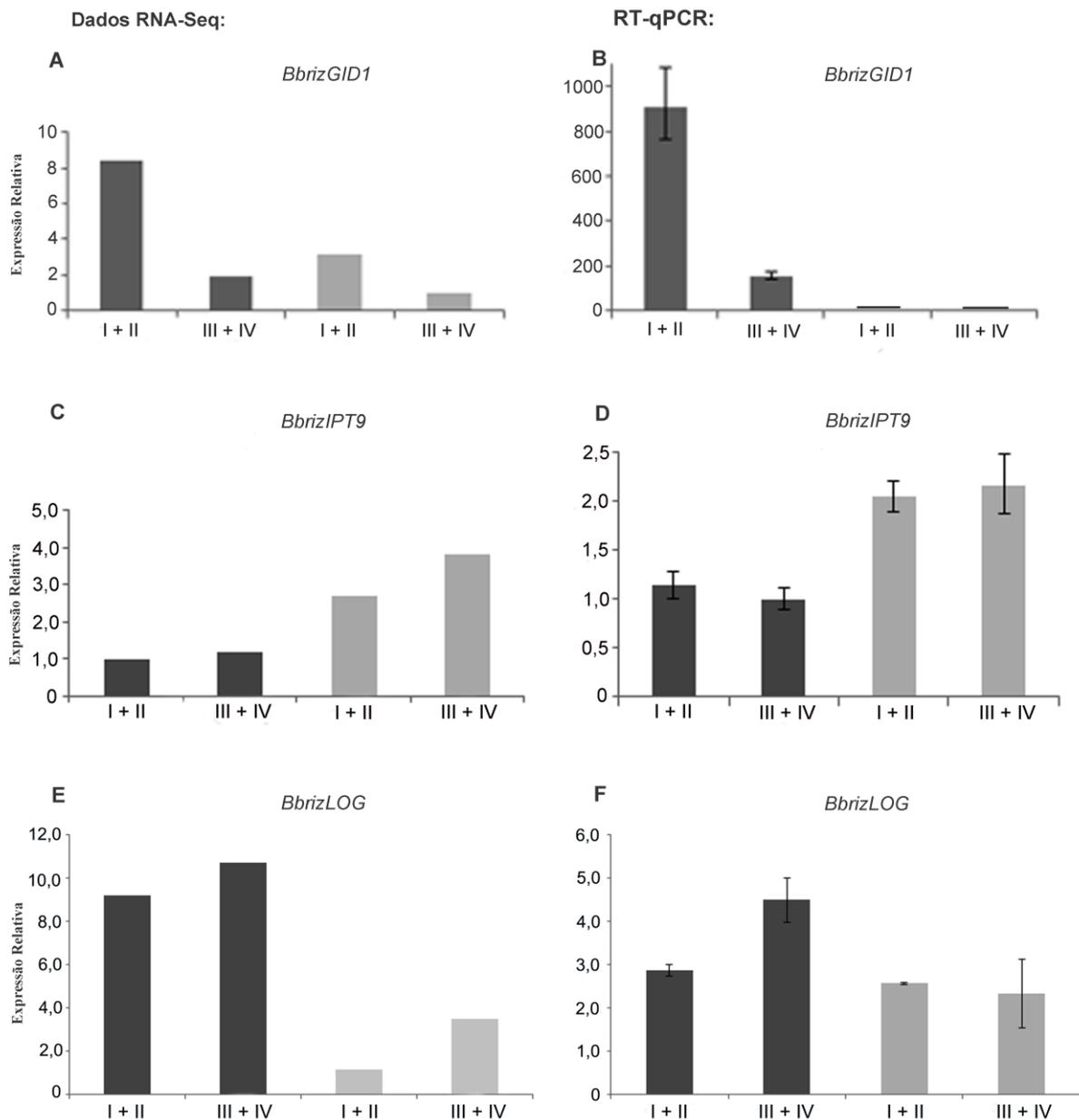


Figura 19. Perfil de expressão relativa de *BbrizGID1* (A e B), *BbrizIPT9* (C e D), e *BbrizLOG* (E e F). Análise de dados da biblioteca de RNA-seq (A, C e D) mostrando o perfil de expressão em ovários de plantas apomíticas (■) e de plantas sexuais (■) nos estádios de megasporogênese (I +II) e megagametogênese (III + IV) e análise da expressão obtida por RT-qPCR (B, D e F) nos mesmos estádios de desenvolvimento do ovário, megasporogênese (I +II) e megagametogênese (III + IV). Barras representam o desvio padrão com base na média de três amostras biológicas.

Comparou-se o nível de expressão por RT-qPCR entre os diferentes estádios de desenvolvimento de ovários de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*, utilizando pistilos em quatro estádios diferentes de desenvolvimento (ARAUJO et al., 2000;

RODRIGUES, et al., 2003). Os ovários de pistilos no estágio I, correspondentes ao início da megasporogênese, apresentaram maior expressão de *BbrizGID1*, enquanto a expressão diminuiu nos estádios de desenvolvimento posteriores, tanto em plantas apomíticas quanto em sexuais de *B. brizantha*. Ao nível de 5% de significância a análise do desvio (ANODEV) mostrou que os modos de reprodução apomíticos e sexuais, não interferem na expressão de *BbrizGID1*, ou seja, não há diferenças significativas entre os modos de reprodução ($F=0,9039$, GL resposta = 19, GL modo R = 1, $p = 0,3537$). Entretanto, entre os estádios I, II e III do desenvolvimento do óvulo de plantas apomíticas e sexuais há diferenças significativas ($F = 49,66$, GL = 19, GL = 3, $p = 0,0001$) (Figura 20).

A análise de expressão por RT-qPCR foi também realizada para *BbrizIPT9* nos quatro diferentes estádios de desenvolvimento do ovário e a maior expressão foi detectada nos três primeiros estádios de desenvolvimento dos ovários de plantas sexuais. O teste do desvio (ANODEV) mostrou, com 1% de significância, que os modos de reprodução apomítica e sexual interferem no perfil de expressão de *BbrizIPT9*, portanto, há diferença significativa entre os modos de reprodução ($F=43.0960$, GL = 1, $p = 2.764e^{-06}$). Quanto aos estádios de desenvolvimento dos ovários (I, II, III e IV) de plantas apomíticas e sexuais, a ANODEV mostrou que os estádios não interferem no perfil de expressão de *BbrizIPT9* ($F=2.8013$, GL=3, $p=0.0678$), não tendo diferenças significativas entre os estádios de desenvolvimento com o mesmo modo de reprodução (Figura 20).

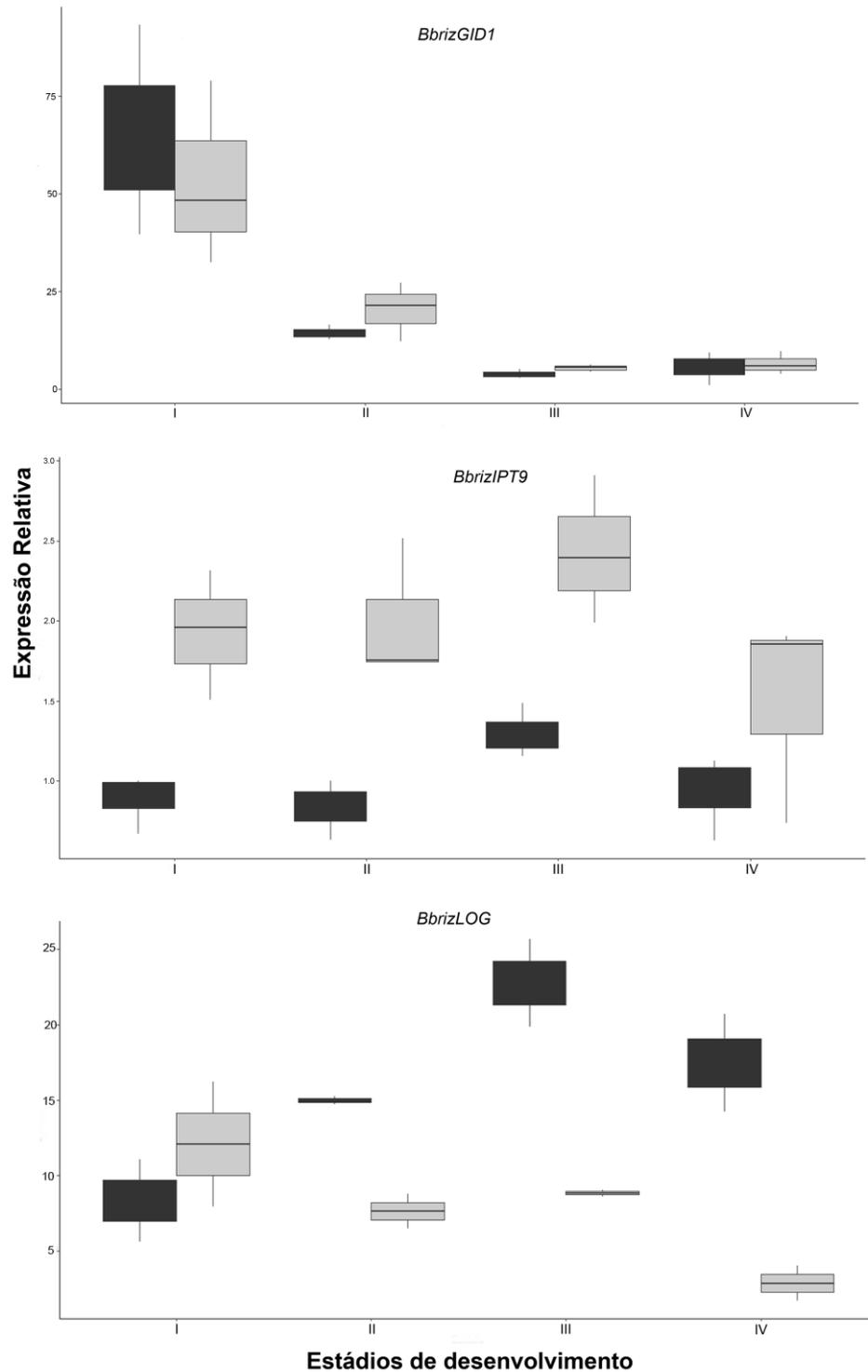


Figura 20. Boxplot mostrando a expressão relativa de *BbrizGID1*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* por RT-qPCR. Análise da expressão em ovários nas diferentes fases do desenvolvimento, antes da antese (I, II, III e IV), de plantas apomíticas (■) e de plantas sexuais (■). Barras representam o desvio padrão com base na média de três réplicas biológicas. Os quartis médios, mediana e ANODEV foram calculados no programa R Core Team (2016). A diferença significativa foi observada entre os modos de reprodução, apomítica e sexual, e entre os estádios de desenvolvimento do ovário ($p < 0,05$).

A análise de expressão relativa de *BbrizLOG* mostrou expressão diferencial significativa entre os modos de reprodução, apomítica e sexual, nos estádios II, III e IV de desenvolvimento do ovário. A maior expressão foi detectada no estágio III, início da megagametogênese, e não foi verificada diferença significativa de expressão no estágio I entre plantas apomíticas e sexuais. Ao nível de 5% de significância o teste do desvio (ANODEV) mostrou que os modos de reprodução apomítica e sexual interferem no perfil de expressão de *BbrizLOG* ($F=8.7269$, $GL = 1$, $p = 0.01046$). Quanto aos estádios de desenvolvimento dos ovários de plantas apomíticas e sexuais (I, II, III e IV), a ANODEV mostrou que os estádios não interferem no perfil de expressão deste gene ($F=0.5228$, $GL=3$, 0.6747), não tendo diferenças significativas entre os estádios de desenvolvimento de ovários de plantas com o mesmo modo de reprodução (Figura 20).

4.4 Localização da expressão in situ dos genes em estudo em ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual

A hibridização in situ de *BbrizGIDI*, *BbrizIPT9* e *BbrizLOG* foi realizada nos estádios iniciais do desenvolvimento do ovário de plantas sexuais e apomíticas de *B. brizantha*, para entender a localização celular da expressão destes genes nos eventos iniciais do desenvolvimento do óvulo e inferir sobre sua relação com os principais eventos de diferenciação do SE.

Os transcritos de *BbrizGIDI* nos estádios iniciais do desenvolvimento do SE de plantas apomíticas e sexuais foram observados (Figura 21). As secções coradas com laranja acridina mostraram a presença de RNA preservado em nucléolos e citoplasma das células dos ovários de plantas sexuais (Figura 21A) e apomíticas. A sonda antisense de *BbrizGIDI* nos estádios iniciais da megasporogênese resultou em forte sinal de hibridização na CMM de plantas sexuais (Figuras 21B e 21C) e apomíticas (Figuras 21E, 21F e 21G). As células nucelares, no início da megasporogênese, de ovários sexuais apresentaram sinal fraco de hibridização (Figuras 21B e 21C) em comparação com a forte marcação nas células nucelares de apomíticos (Figuras 21F e 21G). Foi interessante observar uma forte expressão de *BbrizGIDI* nas células nucelares, apenas na região onde as iniciais apospóricas aparecem, diferente do que foi observado no ovário sexual, em que a expressão foi detectada apenas nas CMMs. Os tegumentos interno e externo tanto nas plantas sexuais quanto nas apomíticas mostraram fraco sinal de hibridização (Figuras 21C e 21F). As anteras apresentaram forte

sinal de hibridização na célula mãe do micrósporo e não foi detectado sinal no tapetum de plantas sexuais e apomíticas (Figuras 21B e 21E). A sonda controle senso não apresentou sinal de hibridização nos ovários sexuais e apomíticos (Figuras 21D e 21H).

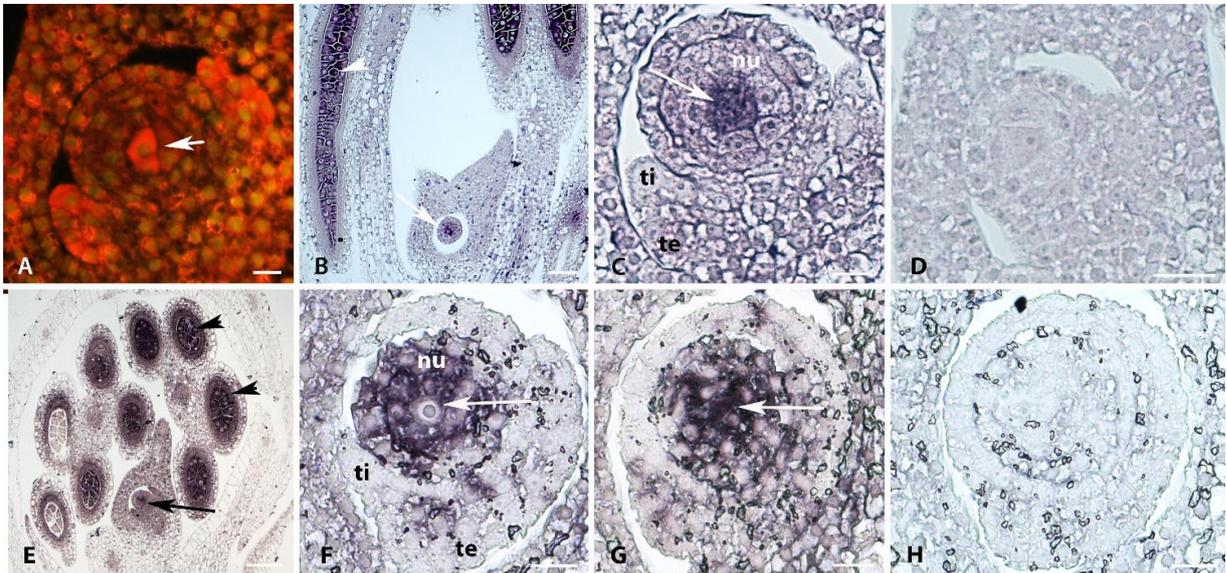


Figura 21. Localização da expressão de *BbrizGID1* por hibridização in situ em secções semi-finas de ovários e anteras de plantas sexuais (A – D) e apomíticas (E – H) de *Brachiaria brizantha*. A - Ovário mostrando preservação do RNA total (laranja), seta indicando a CMM em controle com laranja de acridina. B - Visão geral do ovário apresentando forte sinal de hibridização na CMM (seta) e anteras mostrando forte sinal de hibridização nas células mãe do micrósporo (cabeça de seta). C - Detalhe do óvulo com forte marcação na CMM (seta) e apresentando sinal mais fraco nas células nucelares (nu), e nos tegumentos interno (ti) e externo (te). D - Controle hibridizado com a sonda senso sem sinal. E - Visão geral do ovário de plantas apomíticas apresentando forte marcação na CMM (seta) e anteras com forte sinal de hibridização nas células mãe do micrósporo (cabeça de seta). F - Detalhe do óvulo com forte sinal de hibridização na CMM (seta) e nas células nucelares (nu), e apresentando sinal fraco nos tegumentos interno (ti) e externo (te). G - Secção seguinte do óvulo anterior (F) mostrando o citoplasma da CMM fortemente hibridizado (seta). H - Ovário hibridizado com a sonda senso (controle) e não apresentando sinal. CMM = célula mãe do megásporo; Barras: A = 10 µm, B = 50 µm, C = 12 µm, D = 20 µm, E = 100 µm e F – H = 10 µm.

A localização dos transcritos de *BbrizIPT9* foi observada nos estádios iniciais do desenvolvimento do óvulo, início da megasporogênese, de plantas sexuais e apomíticas (Figura 22). Foi verificado fraco sinal na célula arqueosporica, que posteriormente irá se diferenciar em CMM e forte sinal de hibridização foi detectado na porção superior do estilete de plantas apomíticas (Figura 22A), na CMM também foi detectado forte sinal de expressão quando comparado com as células nucelares (Figura 22B). A sonda controle senso não apresentou sinal de hibridização nos ovários de plantas apomíticas (Figura 22C) e sexuais.

Durante a megasporogênese de plantas sexuais, foi evidenciada forte hibridização na CMM e nas células nucelares próximas (Figura 22E e 22F). Em relação aos tegumentos não foi observado sinal de hibridização em ovários de plantas apomíticas e nem de plantas sexuais (Figura 22F). Nos ovários de plantas sexuais foi detectado forte hibridização nas lodículas (Figura 22G). Anteras de plantas sexuais e apomíticas apresentaram sinal de hibridização na célula mãe do micrósporo (Figuras 22D e 22H).

Transcritos de *BbrizLOG* foram detectados nos estádios de megasporogênese e megagametogênese durante o desenvolvimento do óvulo de plantas sexuais e apomíticas (Figura 23). A sonda controle senso não apresentou sinal de hibridização nos ovários de plantas apomíticas e sexuais (Figuras 23A e 23D). No estádio de megasporogênese em plantas apomíticas, foi observado sinal de hibridização na CMM, forte marcação na célula inicial após-óvica e fraco sinal de hibridização nas células nucelares e tegumentos (Figuras 23B e 23C). Nos ovários de plantas sexuais foi observada forte expressão na CMM e também sinal de hibridização nas células nucelares próximas à CMM (Figuras 23E e 23F). Nos tegumentos interno e externo tanto nas plantas sexuais quanto nas apomíticas não houve sinal de hibridização. Em estádios posteriores de desenvolvimento dos ovários de plantas apomíticas foi observada forte expressão nas células nucelares e nas células do aparato da oosfera. Em plantas sexuais, no estádio de megagametogênese, foi observado sinal de hibridização nas células nucelares e no citoplasma de todas as células do aparato da oosfera (Figura 23G), e não foi observado sinal de hibridização nas antípodas (Figura 23H). Nas anteras de plantas apomíticas (Figura 23I) e sexuais houve forte sinal de hibridização nos micrósporos.

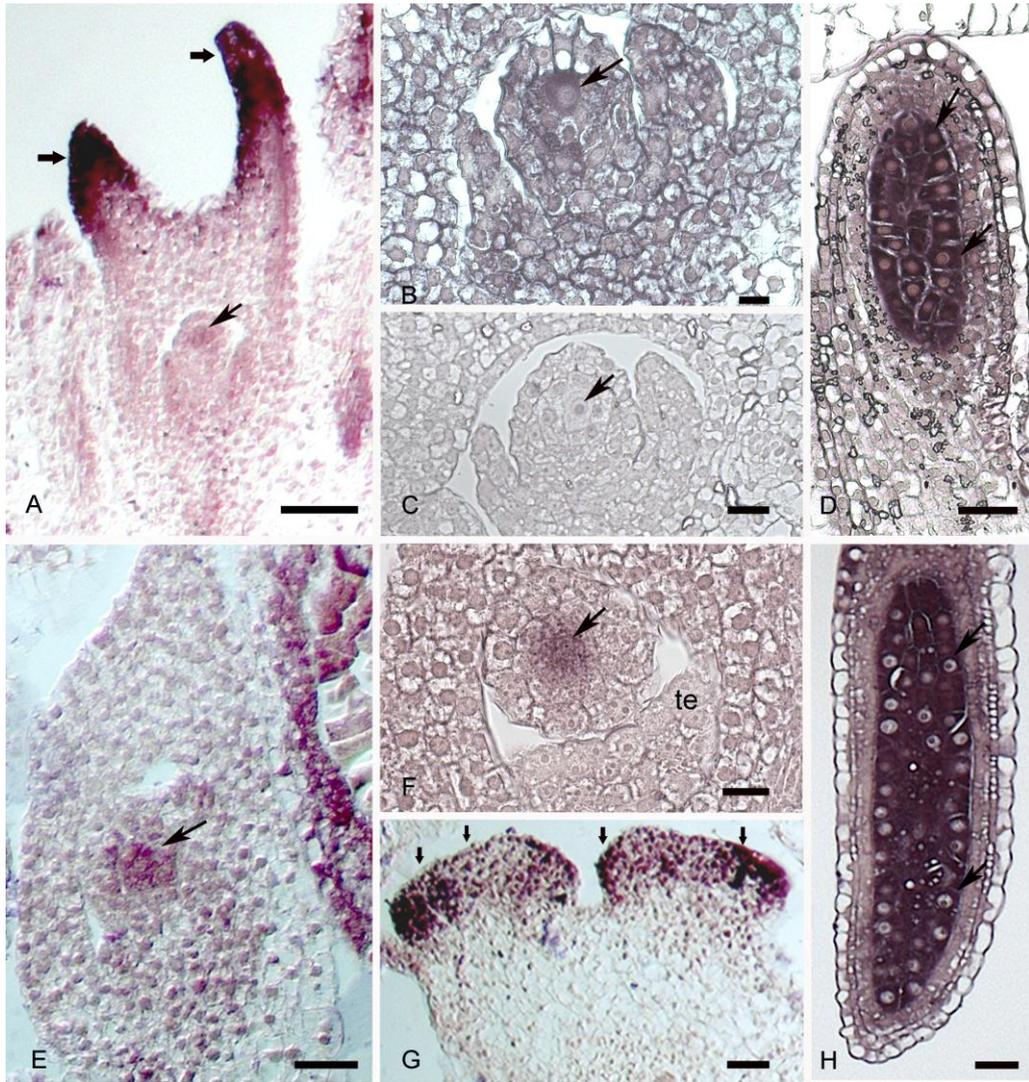


Figura 22. Localização da expressão de *BrizIPT9* por hibridização in situ em ovários e anteras de plantas apomíticas (A – D) e sexuais (E – H) de *Brachiaria brizantha*. **A** - Ovário mostrando pouca marcação na célula arqueosporica (seta fina) e forte hibridização na porção superior do estilete (seta larga). **B** - Detalhe do ovário apresentando sinal de hibridização na CMM (seta). **C** - Ovário hibridizado com a sonda controle senso. **D** - Antera com hibridização nas células mãe do micrósporo (setas). **E** - Ovário de planta sexual com forte sinal de hibridização na CMM e nas células nucleares próximas (seta). **F** - Detalhe do óvulo apresentando forte marcação na CMM (seta) e com pouco sinal de hibridização nos tegumentos (te). **G** - Lodículas de planta sexual com forte hibridização (setas). **H** - Antera de planta sexual com hibridização nas células mãe do micrósporo (setas). CMM = célula mãe do megásporo. Barras: A – B = 10 μ m; C – D = 20 μ m; E – F = 10 μ m ; G – H = 25 μ m.

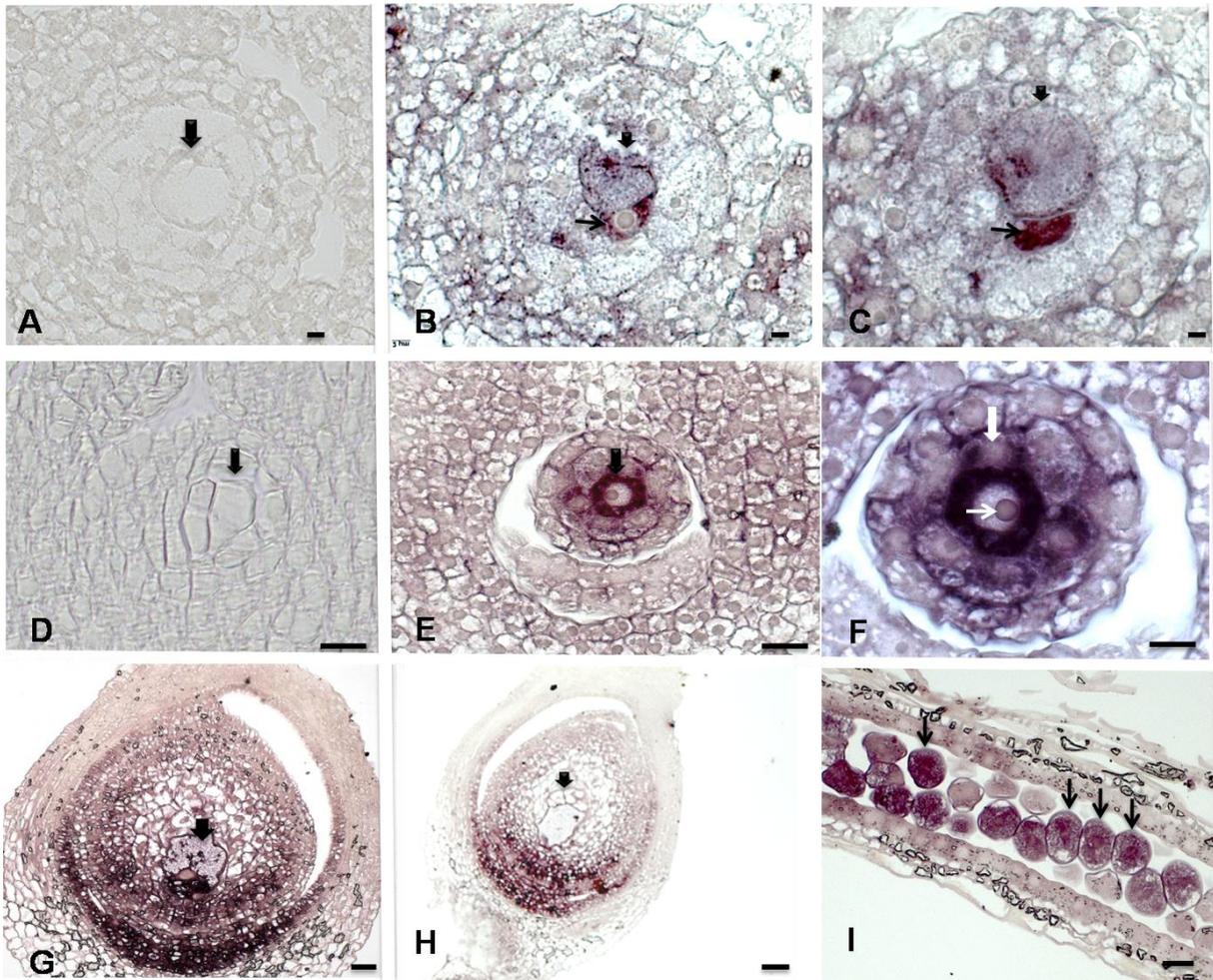


Figura 23. Hibridização in situ de *BbrizLOG* em ovários e anteras de plantas apomíticas (A – C, I) e sexuais (D – H) de *Brachiaria brizantha* nos estádios de megasporogênese e megagametogênese. A - Ovário hibridizado com a sonda controle senso sem sinal, seta indicando a CMM. B – C Ovários apresentando sinal de hibridização na CMM (seta larga) e forte expressão na célula inicial apósporica (seta fina). D - Ovário de planta sexual hibridizado com a sonda controle senso, seta mostrando a CMM. E - Ovário evidenciando forte expressão no citoplasma da CMM (seta larga). F - Detalhe do óvulo mostrando o núcleo da CMM fortemente hibridizado (seta fina) e células nucelares (seta larga). G - Saco embrionário maduro (seta) de planta sexual mostrando hibridização nas células do aparato da oosfera. H - Detalhe das antípodas (seta) em que não houve sinal de hibridização. I - Anteras de plantas apomíticas com forte sinal de hibridização nos micrósporos (setas). CMM = célula mãe do megásporo; Barras: A = 5 μ m; B – C = 2 μ m; D – F = 25 μ m; E, G – I = 10 μ m.

4.5 Determinação da localização de expressão de *GID1* em plantas de *A. thaliana* e alterações fenotípicas pela superexpressão de *AtGID1a* em transgênicos

Com o propósito de verificar a função de *BbrizGID1* *in vivo*, foram realizadas análises fenotípicas de plantas transgênicas, utilizando a planta modelo *A. thaliana*. O gene *BbrizGID1* teve a sua maior expressão detectada nos estádios iniciais de desenvolvimento do ovário de *B.*

brizantha, tanto em plantas apomíticas como em sexuais. Para o estudo deste gene foi realizada a superexpressão, utilizando o promotor constitutivo 35S e o promotor STK, que direciona a expressão para o óvulo.

Para estudar a localização das proteínas GID1 (a, b e c) durante os primeiros estádios de desenvolvimento do óvulo, foram analisadas as linhagens transgênicas de *A. thaliana* *pAtGID1::AtGID1-GUS* (SUZUKI et al., 2009; GALLEGO-GIRALDO et al., 2014) fusionadas ao gene GUS, para reportar o local de expressão de *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c* durante o desenvolvimento dos óvulos de *A. thaliana*, principalmente nos estádios iniciais (Figura 24).

A expressão de GID1, como visualizada nos ensaios de GUS, em inflorescências contendo pistilos antes da antese, sugeriu que as proteínas GID1 são diferencialmente expressas ao longo do desenvolvimento do óvulo em *A. thaliana* (Figura 24A). O sinal GUS foi fortemente detectado nos tegumentos interno e externo dos óvulos das plantas transgênicas *pAtGID1a::AtGID1a-GUS*, no estágio 2-III, em que a CMM está em meiose, e os tegumentos interno e externo já estão em desenvolvimento (SCHNEITZ, K. et al., 1995). Nenhum sinal foi detectado nas CMMs e nas células nucleares (Figura 24B). Nos óvulos maduros a expressão de GUS foi observada em toda a região do óvulo, incluindo o SE e os tegumentos (Figura 24C).

Nas plantas transgênicas *pAtGID1b::AtGID1b-GUS*, o sinal GUS foi localizado nos tegumentos interno e externo no estágio inicial do desenvolvimento do óvulo, estágio 2-III-2-V (SCHNEITZ, K. et al., 1995), e não foi detectada expressão nas CMMs e nas células nucleares (Figuras 24D e 24E). Nos óvulos maduros, no estágio FG7 em que o SE já está formado, o sinal GUS foi localizado principalmente na região da calaza, na base do SE (Figura 24F).

Analisando as plantas transgênicas *pAtGID1c::AtGID1c-GUS* de *A. thaliana*, a expressão de GID1C foi observada especificamente no septo, sendo completamente ausente nos óvulos no estágio 2-III e nos funículos (Figura 24G e 24H).

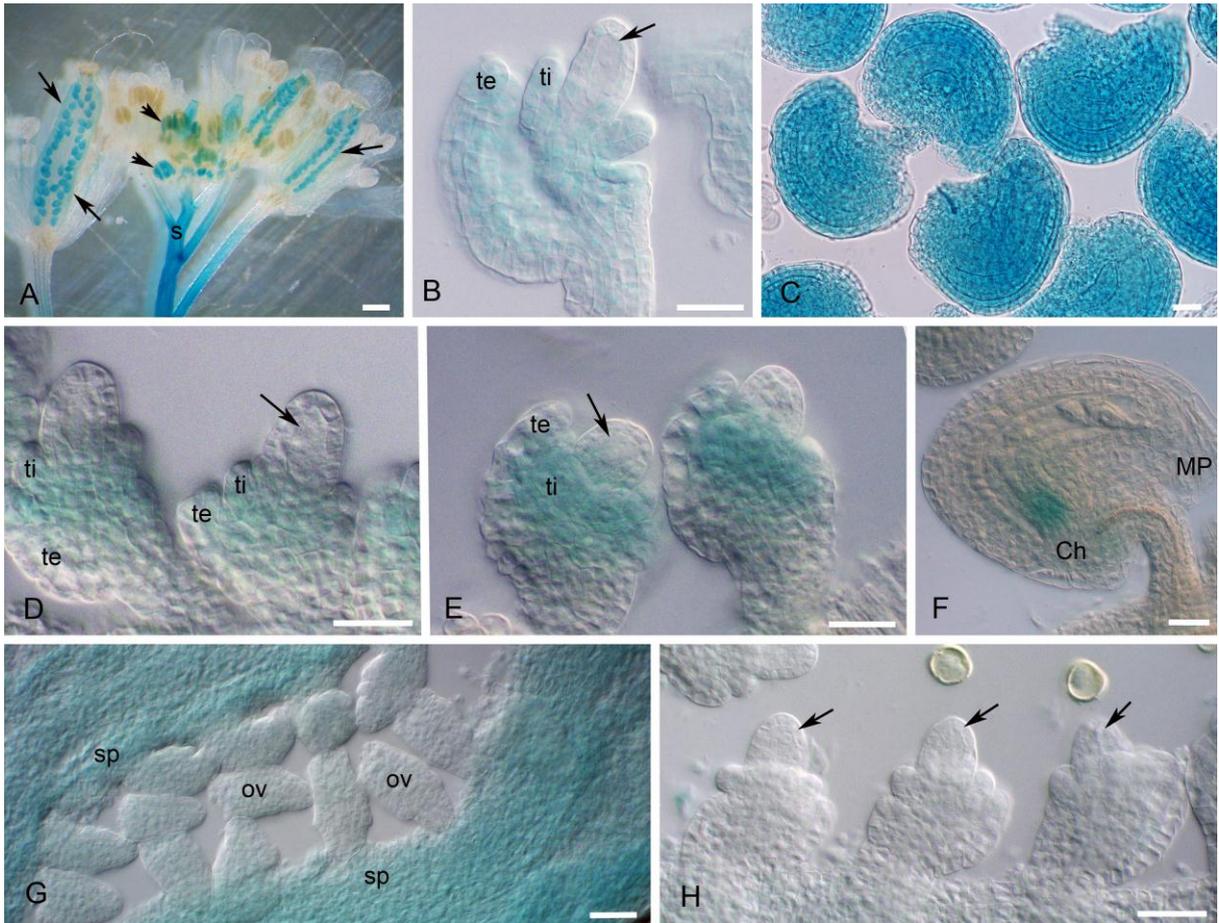


Figura 24. Análise histoquímica de GUS em inflorescências e óvulos de *Arabidopsis thaliana* antes da antese, utilizando as linhagens transgênicas: **A – C:** *pAtGID1a::AtGID1a-GUS*; **D – F:** *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* e **G – H:** *pAtGID1::AtGID1-GUS*. **A** - A expressão de GUS foi observada principalmente no pedúnculo (S), nos óvulos (setas) e nas anteras (cabeças de setas). **B** - No estágio 2-III do desenvolvimento do óvulo, o sinal de GUS foi observado nos tegumentos interno (ti) e externo (te), e não foi detectado na CMM em meiose (seta) e nem nas células nucleares. **C** - Nos óvulos maduros o sinal GUS foi localizado em todo o SE e nos tegumentos. **D – E** No Estádio 2-III (**D**) e FG0 (**E**), o sinal GUS foi observado nos tegumentos interno (ti) e externo (te), e não foi detectado na CMM em meiose (seta) e nem nas células nucleares. **F** - No SE maduro, o sinal GUS foi detectado principalmente na região da calaza (Ch) em comparação com a região da micrópila (MP). **G** - O sinal de GUS foi localizado especificamente no septo (se), mas estava completamente ausente nos óvulos (ov) e funículos. **H** - O sinal GUS foi indetectável nos óvulos, setas mostram as CMMs e as células nucleares. CMM = célula mãe do megásporo; SE = saco embrionário; Barras: A = 1mm; B – F = 20 μ m e G – H = 50 μ m.

A superexpressão de *AtGID1a* nas plantas transgênicas *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a* de *A. thaliana* foi confirmada. Os resultados mostraram que a expressão de *AtGID1a* foi maior nas inflorescências das linhagens transgênicas em relação ao perfil de expressão obtido nas análises com as plantas selvagens, independente do promotor usado (Figura 25). Resultados obtidos (nível de expressão relativa, número total de óvulos

analisados, número de células semelhantes à CMM, porcentagem de óvulos com células semelhantes à CMM por número total de óvulos e número de sementes por síliqua) observados em cada uma das plantas analisadas e que foi utilizado para o cálculo das médias apresentadas nas figuras 25, 27, 29, 31, 33 e 34, encontram-se apresentados no apêndice D.

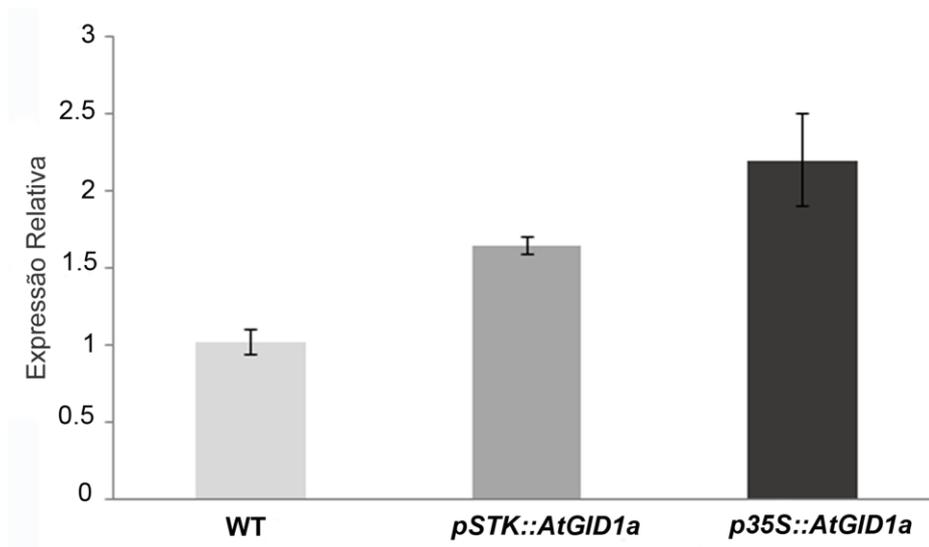


Figura 25. Análise da expressão relativa obtida por RT-qPCR utilizando inflorescências de *Arabidopsis thaliana* superexpressando *AtGID1a* sob o controle do promotor constitutivo 35S (*p35S::AtGID1a*) e do promotor SEEDSTICK específico do óvulo (*pSTK::AtGID1a*). As barras representam o desvio padrão com base na média de três réplicas biológicas. *Actin8* e *Ubiquitin10* foram utilizados como genes de referência. WT: tipo selvagem (ecótipo Columbia).

As análises morfológicas dos óvulos das mesmas plantas *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a* foram realizadas especialmente nos estádios iniciais do desenvolvimento, estágio *finger-like* (2-I), no qual a CMM já está formada (SCHNEITZ, K. et al., 1995). Nos estádios de *finger-like* (2-I), foram observados óvulos com duas células na região central, células adicionais semelhantes à CMM, que foram identificadas pelo seu maior tamanho em relação a outras células nucleares, e pela sua localização central e proximidade com a CMM (Figura 26). Os óvulos das plantas *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a* apresentaram uma assincronia no desenvolvimento dos tegumentos interno e externo em relação aos eventos de megasporogênese, quando comparados com o tipo selvagem. Esses resultados sugerem que a expressão ectópica de *AtGID1a* pode interferir no desenvolvimento correto do tegumento. As células adicionais semelhantes à CMM de plantas superexpressando *AtGID1a* foram

observadas apenas em óvulos no estágio *finger-like* (2-I). Em estádios posteriores de desenvolvimento, observou-se apenas um megásporo funcional, sugerindo que apenas uma CMM completou a divisão meiótica e entrou no processo de gametogênese, já que SE duplos não foram observados durante a análise de óvulos maduros (Figura 26).

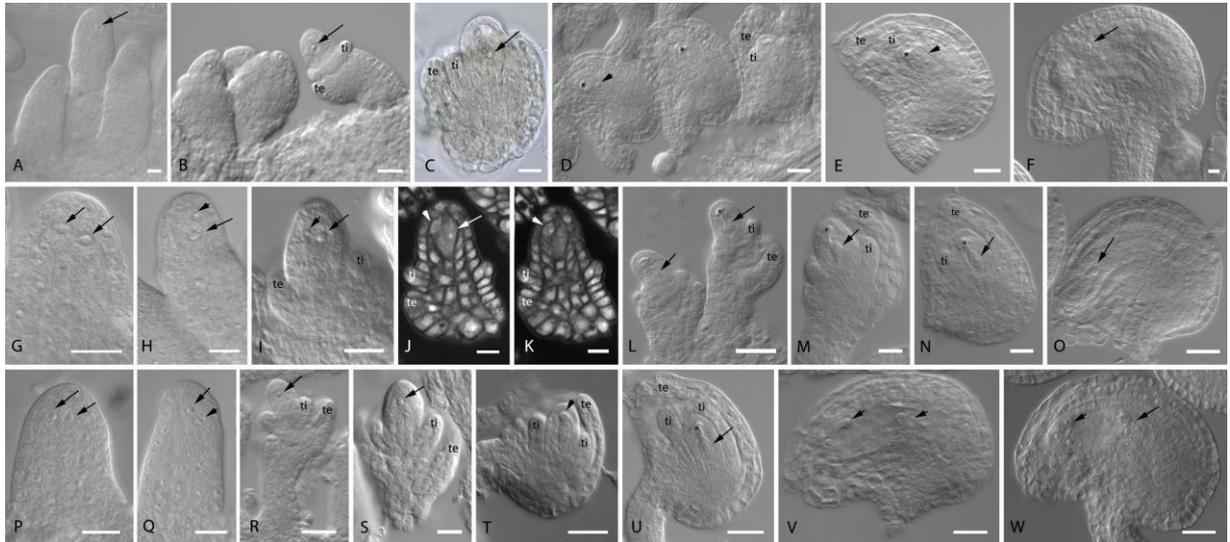


Figura 26. Óvulos de plantas selvagens e linhagens transgênicas *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a* de *Arabidopsis thaliana* nas principais fases do desenvolvimento do óvulo, observados com microscopia ótica de contraste diferencial de fase (A – I; L – W) e microscopia confocal de varredura a laser (J – K). **A – F** = Óvulos de plantas selvagens do ecótipo Columbia durante o desenvolvimento do SE. **A** - Estádio *finger-like* (2-I) mostrando a CMM (seta). **B – C** Estádio 2-III (B) e FG1 (C) indicando o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te) e CMMs (setas). **D** - Estádio FG2 evidenciando os megásporos em degeneração (asteriscos) e o megásporo funcional (setas). **E** - FG3 apresentando megásporos degenerados e SE (seta). **F** - Óvulo maduro no estágio FG6, a seta indica a célula central. **G – O** = Linhagem transgênica *pSTK::AtGID1a*. **G – H** Estádio de *finger-like* (2-I), mostrando a CMM (setas) e células adicionais semelhantes à CMM (cabeças de seta). **I – L** Estádio 2-III mostrando o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te), CMMs (setas) e células semelhantes à CMM (cabeças de seta). **M – N** FG1 mostrando os megásporos em degeneração (asteriscos), megásporo funcional (setas) e tegumentos internos (ti) e externos (te) bem desenvolvidos. **O** - Estádio FG6, a seta indica a célula central. **P – W** = Linhagem transgênica *p35S::AtGID1a*. **P – Q** Estádio de *finger-like* (2-I), visualizando a CMM (setas) e células semelhantes à CMM (cabeças de seta). **R – S** Estádio 2-III mostrando a CMM (setas) e o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te). **T** - Representa uma tétrade (cabeça de seta) e tegumentos interno (ti) e externo (te) em desenvolvimento. **U** - FG1 mostrando o megásporo funcional (seta), megásporos degenerados (asteriscos) e tegumentos bem desenvolvidos. **V** - FG4 mostrando o SE constituído por quatro núcleos, dois núcleos no pólo micropilar e calazal (cabeças de seta). **W** - Estádio FG6 apresentando células antípodas (seta) e os três núcleos no pólo micropilar (cabeça de seta). CMM = célula mãe do megásporo. SE = saco embrionário; Barras: A – B = 20 µm; C = 10 µm; D – F = 20 µm; G – H = 100 µm; I = 50 µm; J – K = 25 µm; L = 100 µm, M = 5 µm; N = 100 µm; O = 10 µm; P – Q = 50 µm; R = 10 µm; S = 5 µm; T – U = 10 µm e V - W = 20 µm.

Em óvulos de *A. thaliana* do tipo selvagem (ecótipo Columbia), também foram observadas células adicionais semelhantes à CMM, mas em número reduzido, 17% do número total de óvulos analisados. Nas plantas *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a*, observaram-se células adicionais semelhantes à CMM em 33% e 32% do número total de óvulos analisados usando promotor pSTK ou p35S, respectivamente. A análise estatística (teste t) mostrou que existe diferença significativa entre o número de células adicionais semelhantes à CMM observadas nas linhagens transgênicas em comparação com o tipo selvagem, independente do promotor utilizado para a superexpressão de *AtGID1a*, pSTK ($p = 0,009$) ou p35S ($p = 0,013$) (Figura 27).

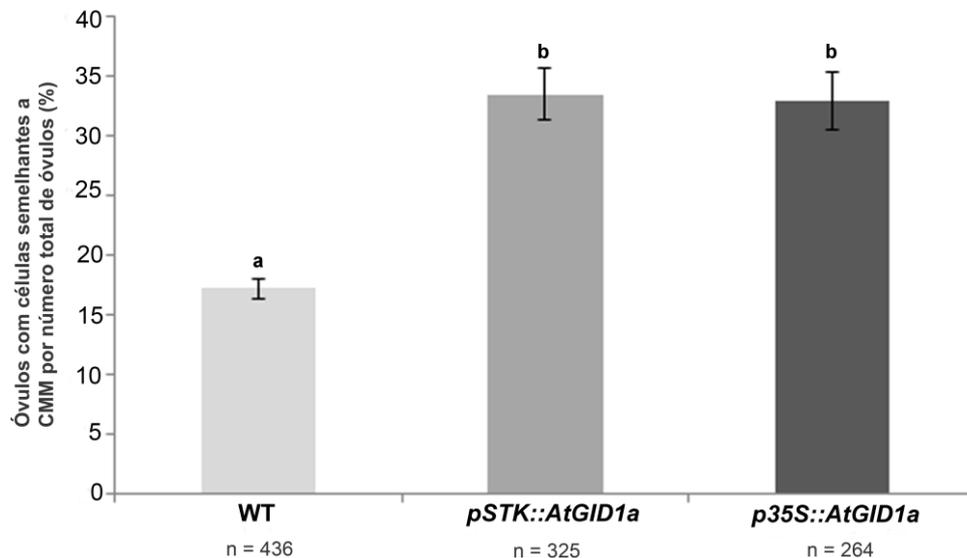


Figura 27. Comparação entre o número de óvulos com células adicionais semelhantes à CMM de plantas selvagens e transgênicas, *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a*, de *Arabidopsis thaliana*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre o número de células adicionais semelhantes à CMM de plantas transgênicas e de tipo selvagem, independentemente do promotor utilizado para a superexpressão de *AtGID1a*, pSTK ($p = 0,009$) ou p35S ($p = 0,013$). WT: tipo selvagem; n = número de óvulos analisados; CMM = célula mãe do megásporo.

Para investigar se as células adicionais semelhantes à CMM possuem identidade de CMM, uma linhagem transgênica *pKNU::nlsYFP* (TUCKER et al., 2012), que possui a expressão de genes marcadores YFP sob o controle do promotor KNUCKLES, dirigida exclusivamente para a CMM, foi transformada com o vetor *p35S::AtGID1a* e as linhagens transgênicas superexpressando *AtGID1a* foram analisadas. A segunda geração das linhagens *pKNU::nlsYFP p35S::AtGID1a* apresentaram um aumento no número das células

semelhantes à CMM em uma taxa de 28%, no entanto, apenas uma célula expressa o sinal da fluorescência YFP, sugerindo que uma das duas células adquiriu a identidade CMM e a outra célula adicional, não possui identidade de CMM (Figura 28).

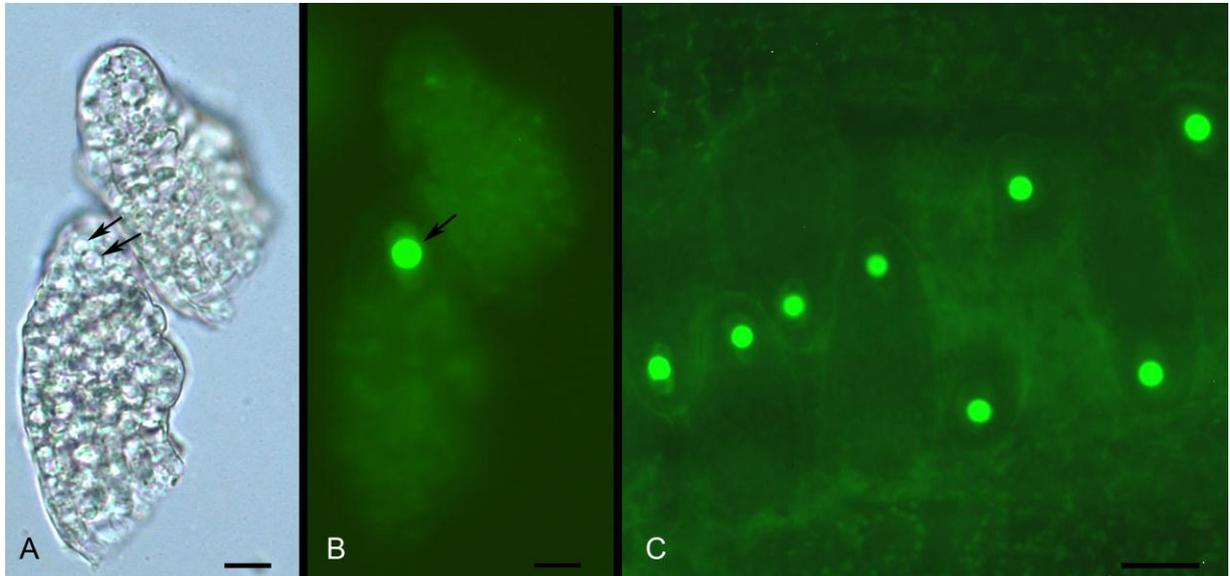


Figura 28. Os óvulos de *Arabidopsis thaliana* da linhagem transgênica *pKNU::nlsYFP* superexpressando *AtGID1a* sob o controle de p35S, com a CMM marcada com a fluorescência YFP. **A** - Óvulos no estágio 2-III com duas células, CMM (seta) e outra célula adicional semelhante à CMM (cabeça de seta). **B** - Óvulo no mesmo momento do anterior usando luz UV e mostrou sinal de fluorescência somente em uma célula, CMM (seta), e não apresentou sinal nas células adicionais semelhantes à CMM das plantas transgênicas. **C** - Óvulos no estágio de *finger-like* (2-I), ilustrando a fluorescência amarela nas células CMM. CMM = célula mãe do megásporo. Barras: A - C = 10 μ m.

A formação das sementes foi analisada em três plantas de cada linhagem transgênica, *p35S::AtGID1a* e *pSTK::AtGID1a*. Nessas plantas o número de sementes por siliqua aumentou relativamente em relação ao tipo selvagem. As plantas transformantes de ambos os genótipos apresentaram uma média de 55 sementes por siliqua, nas 30 síliquas contadas, com 1,5% de sementes abortadas. Enquanto as plantas selvagens, nas mesmas condições ambientais, apresentaram uma média de 46 sementes por siliqua, nas 32 síliquas analisadas, com 2,5% de aborto. A análise estatística (teste t) mostrou diferença significativa entre o número de sementes por siliqua das plantas transgênicas que superexpressam *AtGID1a*, independente do promotor utilizado, pSTK ($p = 0,0009$) ou p35S ($p = 0,001$) em relação às plantas de tipo selvagem (Figura 29).

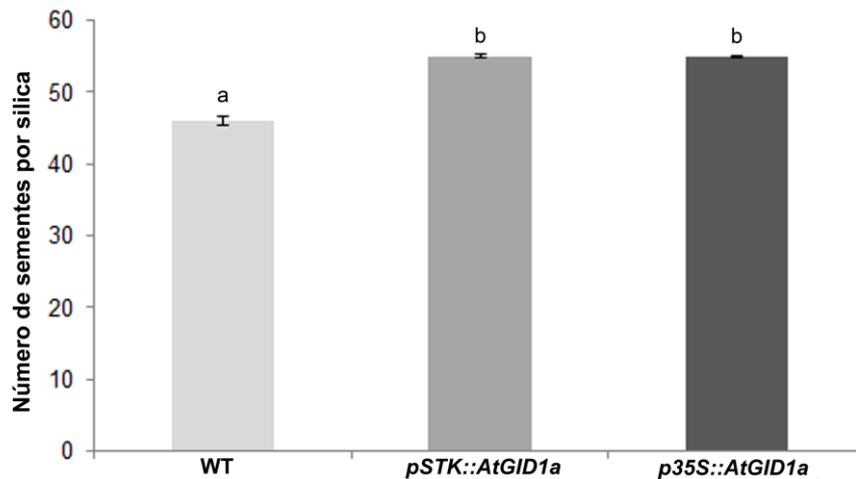


Figura 29. Comparação entre o número de sementes por sílica nas plantas transgênicas *pSTK::AtGID1a* e *p35S::AtGID1a* em relação às plantas de tipo selvagem (WT). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre o número de sementes do tipo selvagem e as plantas transgênicas que expressam ectopicamente *AtGID1a*, independente do promotor utilizado, pSTK ($p = 0,0009$) ou p35S ($p = 0,001$).

4.6 Análise do desenvolvimento de óvulos e sementes de plantas mutantes *ipt9* de *A. thaliana*

O gene *AtIPT9* está localizado no cromossomo cinco de *A. thaliana*, sendo constituído por 1.410 nucleotídeos que codificam 469 aminoácidos, com estrutura genômica formada por dez éxons e nove íntrons. Para análise *in vivo* da expressão do gene *IPT9* foi analisado o mutante SALK_027711 que contém o T-DNA inserido na região promotora do gene *IPT9* (Figura 30).



Figura 30. Estrutura genômica do gene *AtIPT9* (AT5G20040.3) de *A. thaliana*. O local de inserção do T-DNA (SALK_027711) está indicado pelo triângulo na região promotora do gene (3'UTR). Os blocos pretos representam os éxons e os traços finos, os íntrons.

A ausência de expressão do gene *ipt9* foi analisada em linhagem mutante de *A. thaliana* e os resultados mostraram que a expressão relativa de *AtIPT9* foi próxima a zero nas inflorescências de plantas mutantes quando comparada com as selvagens (Figura 31).

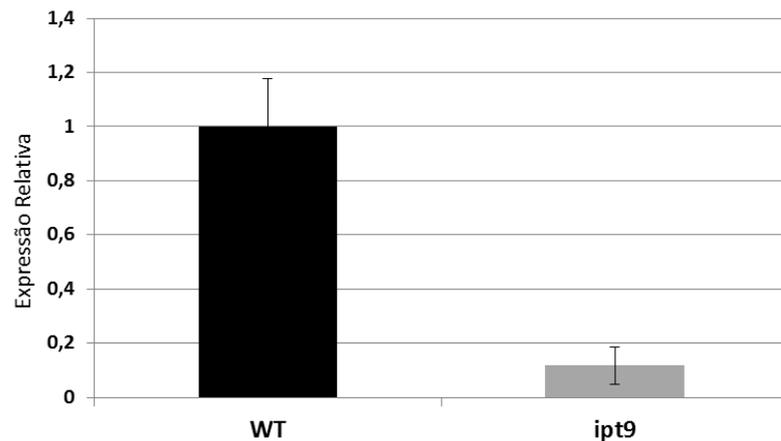


Figura 31. Análise de expressão por RT-qPCR de *AtIPT9* em plantas mutantes *ipt9* e selvagens de *Arabidopsis thaliana*. As barras representam o desvio padrão com base na média de três réplicas biológicas. *Actin8* e *Ubiquitin10* foram utilizados como o gene de referência. WT: tipo selvagem (ecótipo Columbia).

Para análises morfológicas dos óvulos, três plantas de cada mutante *ipt9* foram analisadas, nos estádios iniciais do desenvolvimento, do estádio *finger-like* (2-I) até a formação do SE (SCHNEITZ, K. et al., 1995). A análise do mutante *ipt9* também apresentou células adicionais semelhantes à CMM, na região central do óvulo (Figura 32). Em estádios posteriores de desenvolvimento do óvulo foi observada uma assincronia entre o crescimento dos tegumentos interno e externo, em relação aos eventos de megasporogênese quando comparadas com as plantas selvagens (Figura 32). Esses resultados sugerem que a ausência de *AtIPT9* pode interferir no desenvolvimento correto do tegumento.

As células adicionais semelhantes à CMM observadas em mutantes *ipt9* foram encontradas apenas em óvulos no estádio *finger-like* (2-I). Durante a análise de óvulos maduros de mutante *ipt9* de *A. thaliana* observou-se apenas um megásporo funcional, e duplos SE nunca foram observados. No mutante *ipt9* foram observadas 35% de células adicionais semelhantes à CMM em relação ao número total de óvulos analisados. A análise estatística (teste t) mostrou que existe diferença significativa entre o número de células adicionais semelhantes à CMM observadas no mutante *ipt9* em comparação com o tipo selvagem ($p = 0,038$), que também apresentou células semelhantes à CMM, mas em número reduzido, 17% (Figura 33).

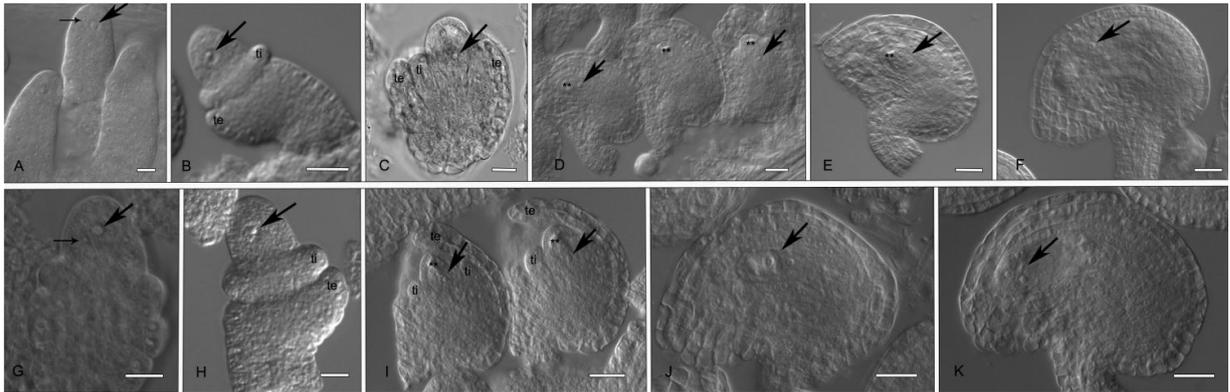


Figura 32. Óvulos de *Arabidopsis thaliana* selvagens ecótipo Columbia (**A – F**) e mutantes *ipt9* (**G – K**) nos principais estádios de desenvolvimento do óvulo, observados com microscopia ótica de contraste diferencial de fase. **A** - Estádio *finger-like* (2-I) mostrando a CMM (seta) e a célula adicional semelhante à CMM (seta fina). **B – C** Estádio 2-III (**B**) e FG1 (**C**) mostrando o desenvolvimento dos tegumentos internos (ti) e externos (te) e CMMs (setas). **D** - FG2 mostrando os megásporos em degeneração (asteriscos) e o megásporo funcional (setas). **E** - FG3 apresentando megásporos em degeneração (asteriscos) e o gametófito feminino em desenvolvimento (seta). **F** - Óvulo maduro no estádio de FG6, a seta indica a célula central. **G** - Estádio *finger-like* (2-I) mostrando a CMM (seta) e a célula adicional semelhante à CMM (seta fina). **H** - FG0 mostrando o início do desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te) e seta mostrando a CMM. **I** - Óvulos nos estádios de FG1 mostrando o desenvolvimento dos tegumentos interno (ti) e externo (te), megásporos em degeneração (asteriscos) e diferenciação do megásporo funcional (seta). **J** - Estádio FG3 mostrando o saco embrionário imaturo binuclear (seta). **K** - Óvulo maduro FG6, seta indica o aparatato da oosfera. CMM = célula mãe do megásporo. Barras = A – B = 20 μ m; C = 10 μ m; D – F = 20 μ m; G = 200 μ m; I – K = 20 μ m.

Nas plantas mutantes de *ipt9* o número de sementes por síliqua foi semelhante ao número de sementes encontrado nas plantas selvagens, ecótipo Columbia. Verificou-se que as plantas mutantes apresentaram uma média de 42 sementes por síliqua e uma taxa de aborto de 1,8%, enquanto as plantas selvagens, sob as mesmas condições ambientais, apresentaram uma média de 46 sementes por síliqua e uma taxa de aborto de 2,5%. A análise estatística (teste t) mostrou que não há diferença significativa entre o número de sementes por síliqua observadas nas plantas mutantes *ipt9* e as selvagens ($p = 0,58$) (Figura 34).

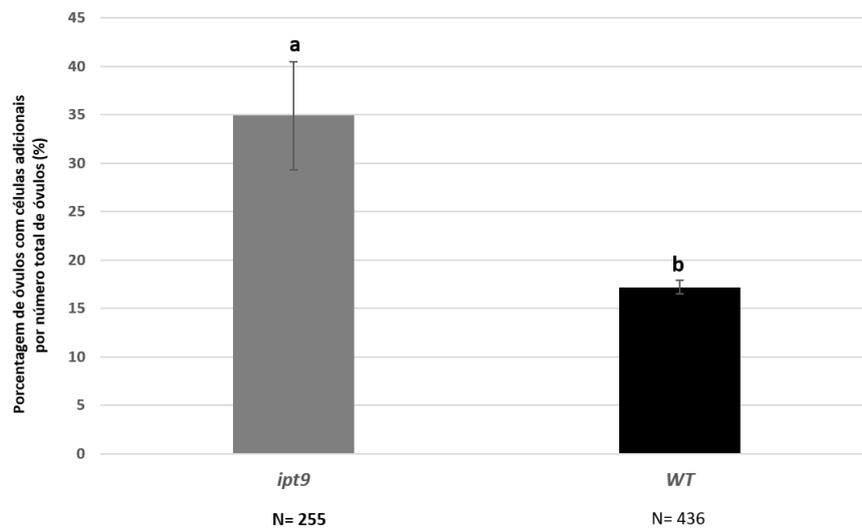


Figura 33. Comparação entre o número de óvulos com células adicionais semelhantes à CMM de linhagens selvagens e mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre o número de células adicionais semelhantes à CMM de plantas mutantes *ipt9* e de tipo selvagem ($p = 0,038$). WT: tipo selvagem; N = número de óvulos analisados; CMM = célula mãe do megáspero.

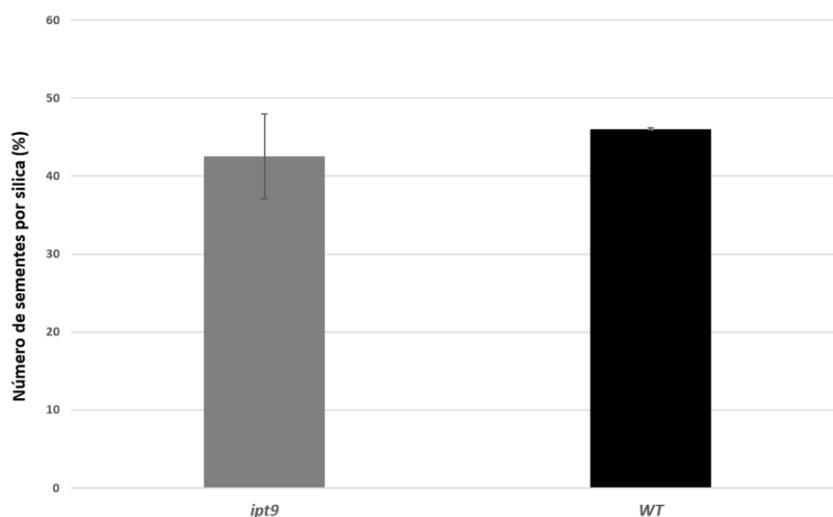


Figura 34. Comparação entre o número de sementes por síliqua nas plantas mutantes *ipt9* em relação às plantas de tipo selvagem (WT). Não houve diferença significativa entre o número de sementes por síliqua observados nos mutantes *ipt9* e nas plantas selvagens ($p = 0,58$).

5 DISCUSSÃO

Os fitormônios participam de redes genéticas que controlam o desenvolvimento e o crescimento das plantas. Entre os fitormônios, as giberelinas são diretamente relacionadas à germinação de sementes, expansão foliar, alongamento do caule e raiz, floração, desenvolvimento de frutos e recentemente foram associadas ao desenvolvimento do óvulo (SUN, 2010; GUPTA; CHAKRABARTY, 2013; GOMEZ et al., 2016). Há relatos na literatura que também os fitormônios citocininas estão relacionados em muitos aspectos de crescimento e desenvolvimento do óvulo, com um papel fundamental no início da formação do pistilo e dos primórdios do óvulo, além na determinação correta do número de óvulos (BARTRINA et al., 2011; BENCIVENGA et al., 2012; CUCINOTTA et al., 2014). Devido a isso e à detecção no banco de RNA-Seq de genes de expressão diferencial em ovários de plantas apomíticas e sexuais, *BbrizGID1*, associado ao receptor de giberelina, *BbrizIPT9* envolvidos na biossíntese de citocinina e *BbrizLOG*, envolvido na ativação de citocinina foram investigados, visando desvendar seu envolvimento na iniciação da formação diferencial dos SE das plantas sexuais e apomíticas de *B. brizantha*. Os resultados apresentados sugerem que estes genes estão envolvidos nos estádios iniciais do desenvolvimento dos óvulos e SE de *B. brizantha*.

O alinhamento da sequência de *BbrizGID1* em bancos de dados mostrou alta similaridade com sequências *GID1* de outras espécies da família Poaceae e os motivos conservados, HGG e GX SXG, da família HSL. Observou-se que três aminoácidos conservados da família HSL formam o centro da tríade catalítica: serina (S), ácido aspártico (D) e histidina (H) (OSTERLUND, 2001). Nas sequências de *BbrizGID1* e de todas *GID1* da família Poaceae, foram verificadas substituições de resíduos deste centro catalítico. Em arroz, uma substituição da H por valina (V) não afetou a atividade de ligação com a giberelina, embora tenha sido detectada ausência de atividade enzimática (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005). Em *B. brizantha*, este mesmo aminoácido, H da tríade catalítica, foi substituído por isoleucina (I) mas os outros aminoácidos da tríade catalítica, S e D, foram conservados. Os resíduos de aminoácidos glicina (G) e arginina (R), conservados em *B. brizantha* e em outras sequências *GID1* da família Poaceae, são essenciais para manter a ligação entre o receptor e a giberelina bioativa em arroz. Qualquer alteração nestes dois aminoácidos ocasiona insensibilidade a giberelina, fenótipo também observado nos mutantes *gid1* (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005; NAKAJIMA et al., 2006). A comparação da sequência de *GID1* de *B.*

brizantha com *A. thaliana* apresentou uma similaridade em torno de 58% com a sequência dos três genes *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c*. Em *A. thaliana*, a análise das combinações de mutantes dos três genes mostrou uma sobreposição de função entre eles e o mutante triplo apresentou deficiência extrema de resposta a giberelina (GRIFFITHS et al., 2006). A complementação com cada gene *AtGID1* recuperou o fenótipo anão do mutante insensível à giberelina em arroz, mostrando a conservação de função entre estas plantas (NAKAJIMA et al., 2006). *BbrizGID1* está presente nos genótipos sexuais e apomíticos de *B. brizantha*. O padrão de restrição do DNA destas plantas, observado após digestão com *HindIII* e hibridização genômica com sonda de *BbrizGID1*, sugeriu um número diferente de cópias do gene em plantas sexuais e apomíticas, sendo pelo menos três e quatro cópias, respectivamente.

A análise quantitativa da expressão de *BbrizGID1* apresentou altos níveis de expressão nos estádios iniciais de desenvolvimento do SE, início da megasporogênese, nos ovários de plantas apomíticas e sexuais, sendo que a expressão diminuiu rapidamente em estádios posteriores. Nos estádios iniciais, a formação da CMM em genótipos sexuais e apomíticos foi observada, mas as células iniciais apospóricas ainda não foram detectadas em apomíticos neste estágio (ARAUJO et al., 2000). A análise desses resultados sugeriu que *BbrizGID1* pode participar do desenvolvimento precoce de ovários de *B. brizantha* sexual e apomítica, quando o desenvolvimento dos tegumentos e a diferenciação da CMM de células nucelares ocorrem. A localização de transcritos de *BbrizGID1* em ovários de *B. brizantha*, de ambos os modos reprodutivos, revelou que este gene está expresso na CMM, enquanto que nas células nucelares circundantes a expressão ocorre apenas nos ovários de plantas apomíticas. A localização da expressão deste gene nas células nucelares, somente em plantas apomíticas, sugerindo a associação da expressão de *BbrizGID1* não apenas com o desenvolvimento da CMM, mas também com as células do nucelo, tecido no qual ocorre a diferenciação das iniciais apospóricas, apenas em plantas apomíticas. Há um grande interesse no estudo de genes que se expressam nos estádios iniciais de desenvolvimento do óvulo, pois a diferenciação entre os SE do tipo *Polygonum* e do tipo *Panicum*, ocorre no início da formação do óvulo, durante a megasporogênese. Assim, genes, como *BbrizGID1*, que são expressos no início do desenvolvimento do óvulo de plantas apomíticas, e em especial em células do nucelo, podem ter papel crucial nos eventos que darão origem à formação do SE do tipo *Panicum*, característico das plantas apomíticas.

A superexpressão de *AtGID1a* em plantas de *A. thaliana* aumentou significativamente o número de células adicionais semelhantes à CMM, na região nucelar do óvulo, quando comparado com o tipo selvagem (ecótipo Columbia). A presença de células adicionais semelhantes à CMM localizadas na mesma região e no mesmo momento da CMM foi previamente relatada no estágio inicial do desenvolvimento do óvulo em diferentes ecótipos de *A. thaliana*, em diferentes proporções (RODRÍGUEZ-LEAL et al., 2015). Para o ecótipo Columbia, a porcentagem descrita foi de 9,6% (RODRÍGUEZ-LEAL et al., 2015), enquanto em nosso trabalho os dados mostraram que 17% dos óvulos do mesmo ecótipo apresentaram estas células. A análise dos mutantes *ago9* apresentou uma porcentagem de células adicionais semelhantes à CMM, que variou entre 37,16% a 47,7% dependendo da variante alélica observada, com identidade de células gaméticas, mas que não sofreram meiose, um fenótipo semelhante àquele que ocorre na reprodução apomítica por aposporia, onde uma célula do nucelo se diferencia e após mitoses sucessivas vai formar um SE não reduzido (OLMEDO-MONFIL et al., 2010).

Em nossas análises tivemos evidências de que as células adicionais semelhantes à CMM não formaram SE, já que duplos SE não foram observados. Isso provavelmente se deve ao fato de que apenas uma destas células completou a divisão meiótica e entrou no processo de gametogênese, uma vez que nunca foi observado mais de um megásporo funcional nos óvulos destas plantas. Duplos SE não foram também observados nos mutantes *ago9* de *A. thaliana* com aumento significativo no número de células adicionais semelhantes à CMM (OLMEDO-MONFIL et al., 2010). Em mutantes heterozigotos de uma RNA-helicase dependente de ATP, *mem-1/MEM* e *mem-2/MEM*, nos quais foram detectadas células semelhantes à CMM na proporção de 18% e 22%, respectivamente, dois megásporos funcionais foram observados por óvulo, no entanto, duplos SE não se desenvolveram (SCHMIDT et al., 2011).

Em nosso trabalho, a identidade da CMM foi investigada nestas células adicionais semelhantes à CMM, que foram observadas na região nucelar do óvulo. Foi utilizada a expressão de genes marcadores de YFP sob o controle do promotor KNUCKLES, que dirige a expressão exclusivamente para a CMM (TUCKER et al., 2012). A análise da linhagem *pKNU:nlsYFP*, superexpressando *AtGID1a* em *A. thaliana*, apresentou apenas uma célula com identidade de CMM em cada óvulo, comparável ao que acontece nas plantas da linhagem *pKNU:nlsYFP*, sugerindo que as células adicionais semelhantes à CMM não possuem

identidade de CMM. A análise da segunda geração do transformante *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a* sugeriu que essa característica é herdada de forma estável, pois apresentou um aumento significativo na diferenciação destas células na região nucelar do óvulo.

Gallego-Giraldo et al. (2014) verificaram previamente a expressão diferencial de *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c* em óvulos de *A. thaliana*, em antese, usando o gene reporter GUS. A expressão de *AtGID1a* foi detectada em todos os tecidos dos óvulos, com maior expressão observada em volta do SE, enquanto a expressão de *AtGID1b* foi observada principalmente na região da chalaza, na base do SE, e *AtGID1c* foi indetectável nos óvulos. Em nosso estudo, observamos a expressão de *AtGID1a*, *AtGID1b* e *AtGID1c* também utilizando o gene reporter GUS, mas durante os estádios iniciais do desenvolvimento do óvulo, antes da antese. *AtGID1a* e *AtGID1b* foram localizados nos tegumentos interno e externo, mas não foi observado sinal nas CMMs e nas células nucleares. O sinal de expressão de *AtGID1c* não foi detectado em óvulos. Nossos resultados sugerem que a expressão de *AtGID1a* e *AtGID1b* está associada ao desenvolvimento dos tegumentos em *A. thaliana*. Anteriormente já foi descrita a associação entre a giberelina e o desenvolvimento dos tegumentos em óvulos de *A. thaliana* (GOMEZ et al., 2016). Em plantas superexpressando *AtGID1a*, em comparação com as plantas de tipo selvagem, uma assincronia entre o desenvolvimento dos tegumentos e o estágio da gametogênese sugeriu que alterações na expressão de *AtGID1a* resultou em um pequeno atraso na megasporogênese ou um crescimento mais rápido dos tegumentos nas plantas transgênicas. Este atraso na gametogênese possivelmente é um efeito ectópico da superexpressão de *AtGID1a* na formação dos tegumentos, e não tem necessariamente associação com a função do gene.

Em consonância com a importância da giberelina no desenvolvimento correto das sementes (GOMEZ et al., 2016), as plantas superexpressando *AtGID1a* foram férteis e não apresentaram diferenças na taxa de aborto, tanto de óvulos como de sementes. Além disso, estas plantas transgênicas apresentaram síliquas com um número significativamente maior de sementes quando comparado com as síliquas de planta selvagens. Como previamente descrito, a análise de mutantes *della global*, sem a presença de proteínas DELLA, apresentou aumento no número de abortos e a densidade de sementes por fruto foi reduzida (GOMEZ et al., 2016), sugerindo que a correta ação da giberelina na planta é necessária para a produção de sementes férteis e alterações na sua expressão ocasionam modificações na formação das sementes.

O alinhamento da sequência de *BbrizIPT9* em bancos de dados mostrou alta similaridade com genes codificadores da *isopentenyltransferase 9* de outras espécies da família Poaceae, relacionadas com a biossíntese de citocininas. As *isopentenyltransferases* são as principais enzimas responsáveis pela síntese de citocininas. Em comparação com as sequências proteicas dos nove genes da família *IPT* de *A. thaliana*, *BbrizIPT9* apresentou similaridade com o *AtIPT9* (53%). Este gene está presente em ambas bibliotecas genômicas de *B. brizantha* sexual e apomítica e codificam a mesma sequência de nucleotídeos nos genótipos apomítico e sexual de *B. brizantha*. A análise de hibridização genômica mostrou que o número de cópias de *BbrizIPT9* é diferente no genótipo sexual e no apomítico de *B. brizantha*. Enquanto no genótipo sexual há ao menos três cópias, no apomítico quatro cópias foram detectadas.

Bencivenga et al. (2012) mostraram que os genes das *isopentenyltransferases* são expressos durante o desenvolvimento do óvulo. Em nosso trabalho, análise da expressão relativa de *BbrizIPT9* apresentou maior nível em ovários de plantas sexuais, nos estádios de megasporogênese e início da megagametogênese, quando comparado com os de plantas apomíticas. A análise de mutantes com este gene silenciado permite examinar se características típicas de plantas apomíticas seriam expressas, ou seja, se a apomixia poderia derivar de uma desregulação do programa de reprodução sexual como sugerido por diversos autores (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003; ORTIZ et al., 2013). Assim, para o estudo de genes associados à apomixia tanto espécies naturalmente apomíticas, quanto mutantes de espécies sexuais têm sido estudadas na tentativa da identificação de genes relacionados com a reprodução. A localização dos transcritos de *BbrizIPT9* apresentou sinal de hibridização nas células CMM tanto de plantas sexuais como de plantas apomíticas de *B. brizantha*, sendo o sinal de hibridização mais forte na CMM de plantas sexuais. Estes resultados sugerem a associação de *BbrizIPT9* com o desenvolvimento da CMM, tanto em plantas sexuais como em apomíticas, relacionando este gene com o desenvolvimento inicial do SE do tipo *Polygonum*, típico de plantas sexuais.

As análises morfológicas dos óvulos do mutante *ipt9* de *A. thaliana* também apresentaram um aumento significativo no número de células adicionais semelhantes à CMM, na região nucelar do óvulo. Fenótipo idêntico e porcentagens semelhantes também foram observados nas plantas transformantes superexpressando *AtGID1a*. Estes resultados sugerem que um desbalanço na expressão destes genes nos óvulos de *A. thaliana*, ocasionado tanto

pela superexpressão de *AtGID1a* ou pela ausência de expressão de *AtIPT9*, promove a diferenciação de células nucelares, onde o início da diferenciação dos SE do tipo *Polygonum* e do tipo *Panicum* ocorre. As células semelhantes à CMM que foram observadas no mutante *ipt9* não tiveram a sua identidade de CMM verificada com o marcador YFP, e, portanto, não se pode descartar a possibilidade destas células apresentarem identidade de CMM. Corroborando a hipótese dessas células não terem identidade de CMM o fato de durante a análise de óvulos maduros não terem sido observados duplos SE, indicando que apenas uma CMM completou a divisão meiótica e entrou no processo de gametogênese. No entanto, como discutido anteriormente, em trabalhos em que foi comprovada a origem gamética das células adicionais semelhantes à CMM, duplos SE também não foram observados (OLMEDO-MONFIL et al., 2010; SCHMIDT et al., 2011). Em estádios posteriores de desenvolvimento, também foi observada uma assincronia entre o desenvolvimento dos tegumentos e os estádios da gametogênese, semelhante às plantas transgênicas superexpressando *AtGID1a*. Estes resultados sugeriram que alterações na via hormonal, seja a expressão ectópica de *AtGID1a* ou a redução da expressão de *AtIPT9*, resultou em um pequeno atraso na megasporogênese ou um crescimento mais rápido dos tegumentos, mas que não interferiu na reprodução das plantas, pois estas produziram sementes viáveis e férteis.

É interessante observar que giberelinas e citocininas, através de um *cross talk* antagônico, exercem efeitos em numerosos processos de desenvolvimento nas plantas, incluindo o alongamento de raiz e caule, diferenciação celular, senescência foliar, desenvolvimento da flor, regeneração de plântulas e atividade meristemática em *A. thaliana* (GREENBOIM-WAINBERG et al., 2005; WEISS; ORI, 2007). Em nosso estudo, é possível que a superexpressão de *AtGID1a* tenha tornado mais moléculas de giberelina bioativas ocasionando a diminuição dos níveis de citocinina nos óvulos de *A. thaliana*, em decorrência de efeitos antagônicos similares àqueles observados entre estes dois fitormônios em outros processos de desenvolvimento (WEISS; ORI, 2007). Isso nos leva a especular se altos níveis de giberelina bioativas e consequentes baixos níveis de citocinina, possam ser a causa da diferenciação das células semelhantes à CMM observada no nucelo dos óvulos de *A. thaliana*. Este mesmo fenótipo foi observado no mutante *ipt9*, que provavelmente teve a sua síntese interrompida pelo silenciamento do gene *AtIPT9*, implicando em diminuição dos níveis de citocinina. Por analogia, os baixos níveis de citocinina podem ter acarretado o aumento dos níveis de giberelina, mesma situação observada na superexpressão de *AtGID1a*,

desencadeando o aparecimento das células semelhantes à CMM na região nucelar dos óvulos de *A. thaliana*. Esta associação também poderia ter acontecido no panorama observado em plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*. A análise de expressão dos ovários de plantas apomíticas apresentou baixos níveis de *BbrizIPT9*, gerando provavelmente baixos níveis de citocininas, enquanto os níveis de *BbrizGID1* foram altos nos estádios iniciais do desenvolvimento do ovário, momento em que ocorre a diferenciação das células nucleares para a formação das células iniciais apospóricas. Já em plantas sexuais de *B. brizantha*, observou-se altos níveis de *BbrizIPT9*, o que provavelmente ocasionou a repressão de gene (s) da via de biossíntese da giberelina, à semelhança do que foi observado em outros processos de diferenciação em *A. thaliana* (GREENBOIM-WAINBERG et al., 2005; WEISS & ORI, 2007), evitando a diferenciação das células nucleares no ovário de plantas sexuais de *B. brizantha*. Essa mediação não seria realizada pelo receptor GID1, já que altos níveis de expressão deste gene foram detectados nos estádios iniciais do desenvolvimento do óvulo de plantas sexuais, pois, este sistema requer um equilíbrio dinâmico entre estes dois fitormônios, e um receptor de GID1 não seria adequado para ser o agente principal de *cross talk* entre essas vias de sinalização. Estas análises nos levam à indicação de que está ocorrendo um *cross talk* de forma antagônica entre os dois fitormônios, citocinina e a giberelina, para o desenvolvimento diferenciado dos óvulos de plantas sexuais e apomíticas.

A aplicação exógena de citocinina, a expressão ectópica de *IPT*, ou a diminuição da expressão dos genes responsáveis pela degradação da citocinina (CKX) tem, ocasionalmente, aumentado o rendimento das sementes, sugerindo que os níveis de citocinina podem ser limitantes para o rendimento das sementes (JAMESON; SONG, 2016). A análise das síliquas do mutante *ipt9*, não mostrou diferença significativa entre o número de sementes em relação às plantas selvagens, ou seja, a redução da expressão de *AtIPT9* não interferiu no número de sementes. Neste caso pode estar ocorrendo uma sobreposição de funções entre o gene *AtIPT9* e *AtIPT2*, já que os dois são responsáveis pela síntese do mesmo tipo de citocinina (cZ) (MIYAWAKI et al., 2006). A análise de mutantes simples, *ipt9* e *ipt2*, não apresentaram alterações morfológicas drásticas (MIYAWAKI et al., 2006), sugerindo uma redundância de funções entre estes dois genes.

Em *A. thaliana*, a família gênica *AtLOGs* está envolvida na via de ativação direta da citocinina, sendo fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal da planta (KUROHA et al., 2009). *BbrizLOG* está presente em ambas bibliotecas genômicas de *B.*

brizantha sexual e apomítica, constituído por sete éxons e seis íntrons. A sequência nucleotídica detectada entre os genótipos apomítico e sexual apresentou divergência de 465 nucleotídeos detectados somente nas regiões dos íntrons, pois as sequências codificadoras são idênticas entre as plantas de *B. brizantha* apomítica e sexual estudadas. O alinhamento de *BbrizLOG* em bancos de dados mostrou alta similaridade com sequências de plantas da família Poaceae e a análise deste gene no NCBI *Conserved Domain Search* indicou um motivo altamente conservado PGGXGTXXE comum com a família *lysine decarboxylase*. Este motivo é apontado como provavelmente importante para a funcionalidade da proteína. Em comparação com as sequências proteicas dos nove genes da família *LOG* de *A. thaliana*, *BbrizLOG* apresentou maior similaridade com os genes *AtLOG4* (80%), *AtLOG3* (80%) e *AtLOG1* (79%). A análise de hibridização genômica mostrou que *BbrizLOG* possui apenas uma cópia no genoma de *B. brizantha*, em ambos genótipos, sexuais e apomíticos.

A análise de expressão relativa de *BbrizLOG* apresentou maior expressão quantitativa nos ovários de plantas apomíticas, exceto no estágio I, quando comparado com a expressão observada em ovários de plantas sexuais. Durante a megasporogênese foi observado sinal de hibridização de *BbrizLOG* na CMM de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*, sugerindo a participação deste gene no início do desenvolvimento do SE sexual, corroborado pelos dados de expressão quantitativa que não mostrou diferença de expressão entre estes dois modos de reprodução neste estágio inicial do desenvolvimento. Além disso, *BbrizLOG* se destacou por apresentar forte expressão na célula inicial apospórica, células nucleares que se diferenciam autonomamente e desenvolvem SE não reduzidos e posteriormente formam o embrião apomítico (ARAUJO et al., 2000). Este resultado sugere a associação deste gene com o desenvolvimento autônomo das células iniciais apospóricas, considerada a célula-chave para o entendimento da reprodução apomítica, na região nuclear do óvulo. Em estádios posteriores de desenvolvimento dos ovários foi observada forte expressão de *BbrizLOG* nas células nucleares e nas células do aparato da oosfera de plantas sexuais e apomíticas, indicando a participação deste gene também durante a megagametogênese, na fase final do desenvolvimento do SE de tipo *Polygonum* e de tipo *Panicum*, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou que os três genes estudados, associados às vias de fitormônios, atuam no desenvolvimento reprodutivo de *B. brizantha*. Neste trabalho foi demonstrado, pela primeira vez em plantas de reprodução apomítica, que genes associados a vias de fitormônios se expressam diferencialmente nos estádios iniciais do desenvolvimento dos ovários de *B. brizantha* sexual e apomítica. *BbrizGID1* se expressa nas células nucleares de plantas apomíticas. *BbrizIPT9* se expressa em óvulos de sexuais e apomíticos, apresentando sinal mais forte de expressão na CMM de plantas sexuais. *BbrizLOG* se expressa nas células específicas de diferenciação do SE de plantas apomíticas, células iniciais apospóricas.

Em *A. thaliana*, os fenótipos similares ocasionados pela superexpressão de *AtGID1a* e a ausência de expressão de *AtIPT9*, nos levou a especular que esteja ocorrendo um *cross talk* de efeitos antagônicos entre estes fitormônios. Este *cross talk* teria desencadeado a diferenciação de células na região nuclear dos óvulos, sugerindo a associação destes genes com os primeiros eventos de desenvolvimento do óvulo e SE. É importante ressaltar que foram alteradas características na diferenciação de células nucleares em momentos cruciais da megasporogênese de *A. thaliana*. Em *B. brizantha*, em momento equivalente da megasporogênese, ocorrem os principais eventos que levarão à formação diferencial dos SE de plantas sexuais e apomíticas de *B. brizantha*.

Um conhecimento mais profundo dos mecanismos que regulam os eventos reprodutivos irá contribuir para a compreensão do controle genético da via apomítica. O sistema de estudo comparativo do desenvolvimento de ovários de plantas de reprodução sexual e apomítica utilizado nesse trabalho demonstrou eficácia.

7 PERSPECTIVAS

- Identificação de novos genes associados ao desenvolvimento diferencial do SE de plantas apomíticas e sexuais poderá ser realizada utilizando o sistema comparativo entre os modos de reprodução apomítico e sexual de *B. brizantha*. Os dados de expressão diferencial disponíveis nas bibliotecas de RNA-Seq de ovários de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha*, nos estádios de megasporogênese e megagametogênese, poderão ser prospectados com sucesso neste sistema.

- Identificação de novos genes com um papel na especificação e diferenciação das células iniciais apospóricas poderá fornecer novos conhecimentos sobre os mecanismos moleculares relativos à megasporogênese. A análise do transcriptoma célula-específico de células iniciais apospóricas e tecidos nucelares circundantes, assim como o transcriptoma de CMMs de *B. brizantha*, poderá levar à identificação de novos genes candidatos envolvidos neste passo crucial da reprodução por apomixia.

- O uso da planta modelo *A. thaliana* para a caracterização funcional *in vivo* dos similares aos genes identificados em *B. brizantha*, permitiu análises morfológicas e fenotípicas comparativas. A participação de novos genes no desenvolvimento reprodutivo de *A. thaliana* é viável, utilizando o mesmo sistema. Plantas transgênicas *pSTK::AtLOG4* foram desenvolvidas no Laboratório de Reprodução Vegetal neste sentido e deverão ser analisadas.

- A utilização da linhagem transgênica *pKNU:nlsYFP*, que dirige a expressão exclusivamente para a CMM, foi eficiente para verificar a identidade de CMM nas células adicionais semelhantes à CMM, e portanto, esta estratégia também poderá ser utilizada para verificar a identidade das células semelhantes à CMM detectadas no mutante *ipt9*.

- As células semelhantes à CMM, identificadas neste trabalho, poderão ter a sua identidade gamética investigada através do uso de marcadores específicos que se expressam no megásporo funcional e no SE em desenvolvimento, como realizado em outros trabalhos.

- A análise do mutante *ipt9* (SALK_027711) disponível em bancos de mutantes de *A. thaliana* foi promissora e nos permitiu inferir sobre a caracterização funcional deste gene nos estádios iniciais do desenvolvimento do óvulo, e a análise de outro mutante *ipt9* (SALK_128927) deverá certificar se as alterações verificadas são devidas ao silenciamento de *AtIPT9* ou ao local de inserção do T-DNA no gene.

- Na hipótese do *cross talk* entre as vias de giberelina e citocinina ser responsável pelas alterações morfológicas em óvulos analisadas em nosso trabalho, a identificação de genes que intermediariam estas vias poderia elucidar elementos fundamentais. As bibliotecas de RNA-Seq de ovários de plantas apomíticas e sexuais de *B. brizantha* poderão ser prospectadas para os possíveis mediadores de *cross talk*. Em *A. thaliana*, estes genes responsáveis por alterações em outros momentos do desenvolvimento foram reportados, como o gene *KNOXI* (KNOTTED1-like homeobox), um dos agentes principais dessa sinalização entre os metabolismos de giberelina e citocinina no desenvolvimento do meristema apical de *A. thaliana*.

- Em *A. thaliana*, a confirmação de que as plantas superexpressando *AtGID1a* estariam, em consequência, aumentando os níveis de giberelina bioativa e reprimindo a produção de citocinina e, por outro lado, a verificação de que o mutante *ipt9* estaria produzindo altos níveis de giberelinas, poderia corroborar a hipótese de que haja um *cross talk* antagônico entre estes dois fitormônios.

- O estabelecimento de estratégias de transformação de alta eficiência de plantas apomíticas e de outras monocotiledôneas abrirá novas perspectivas de estudos de caracterização funcional de gene. Em plantas monocotiledôneas para as quais protocolos de transformação eficiente já foram estabelecidos como setaria, arroz, milho, a apomixia não foi reportada. A obtenção de um protocolo eficiente de transformação de plantas de *B. brizantha* contribuirá para a análise do efeito desses genes em ovários de plantas em que a apomixia já foi detectada e poderá inferir mais diretamente a relação dos genes com o desenvolvimento diferencial dos SE de plantas apomíticas e sexuais.

- Estudos em outras espécies forneceram evidências do envolvimento da regulação epigenética na diferenciação de SE de plantas sexuais e apomíticas por aposporia, durante a megasporogênese. Análises epigenéticas vêm sendo realizadas na Embrapa e poderão contribuir para o entendimento da relação das alterações epigenéticas e a apomixia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, E.; MARCONI, G.; REALE, L.; et al. SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. **Plant Physiology**, v. 138, n. 4, p. 2185–2199, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T.; ARAUJO, A. C. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, 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. 3–4, p. 161–171, 2007.
- ARAUJO, A. C. G.; FALCÃO, R.; CARNEIRO, V. T. DE C. Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v. 20, n. 3, p. 109–121, 2007.
- ARAUJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual: *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de cytologie et de biologie végétales, Le Botaniste**, v. 23, n. 1–2, p. 13–26.
- ARAUJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Révue de Cytologie et de Biologie Végétales - Le Botaniste Tome**, v. XXIII, n. 1–2, p. 13–28, 2000.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras Tropicais no Brasil. **Arch Zootec**, v. 57, n. R, p. 61–76, 2008.

ASKER, S.; JERLING, L. **Apomixis in Plants**. CRC Press, 1992.

BARCACCIA, G.; ALBERTINI, E. Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. **Plant Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 159–179, 2013.

BARTRINA, I.; OTTO, E.; STRNAD, M.; WERNER, T.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 69–80, 2011.

BENCIVENGA, S.; SIMONINI, S.; BENKOVA, E.; COLOMBO, L. The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 24, n. 7, p. 2886–2897, 2012.

BRASELTON, J. P.; CLULOW, S.; WILKINSON, M. J. Feulgen staining of intact plant tissues for confocal microscopy. **Biotechnic and Histochemistry**. v. 71, p. 84–87, 1996.

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, n. março/abril, 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, 2004.

CARNEIRO, V. T. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; SILVEIRA, E. D.; et al. Deep sequencing-based transcriptome of *Brachiaria brizantha* as a tool for development studies of sexual and apomictic plants. Plant and Animal Genome XXI. **Anais...** . v. P0040, 2013. San Diego, CA: Intlpag.org.

CHENG, C.-Y.; KIEBER, J. J. The role of cytokinin in ovule development in *Arabidopsis*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 3, p. e23393, 2013.

CHENG, Y.; DAI, X.; ZHAO, Y. Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, n. 8, p. 2430–2439, 2007.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; et al. Multiple sequence alignment with the

Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3497–3500, 2003.

CLOUGH, S.; BENT, A. Simplified *Arabidopsis* transformation protocol. **Transformation**, p. 8–9, 1998.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 735–743, 1998.

CUCINOTTA, M.; COLOMBO, L.; ROIG-VILLANOVA, I. Ovule development, a new model for lateral organ formation. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–12, 2014.

CUCINOTTA, M.; MANRIQUE, S.; GUAZZOTTI, A.; et al. CYTOKININ RESPONSE FACTORS integrate auxin and cytokinin pathways for female reproductive organ development. **Development**, v. 143, n. October, p. 4419–4424, 2016.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 139, p. 5–17, 2005.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 11, n. 2, 2012.

DAVIÈRE, J.-M.; ACHARD, P. Gibberellin signaling in plants. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 6, p. 1147–51, 2013.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19–21, 1983.

DREWS, G. N.; KOLTUNOW, A. M. G. The female gametophyte. **The Arabidopsis Book**, p. 1–24, 2011.

DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**, 2001. Wageningen: University of Wageningen.

DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Activity and localisation of sucrose synthase and invertase in ovules of sexual and apomictic *Brachiaria decumbens*. **Protoplasma**, v. 208, n. 1–4, p. 173–185, 1999.

EDWARD, A. C.; JORDAN, J. R.; DREWS, G. N. Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the *Gf* mutant. **Sex Plant Reproduction**, p. 49–64, 1997.

EDWARDS, K. C.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1349., 1991.

ELLIOTT, R. C.; BETZNER, A. S.; HUTTNER, E.; et al. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. **The Plant Cell**, v. 8, p. 155–168, 1996.

FERREIRA, L.G.; DUSI, D.M.A.; IRSIGLER, A.S.T.; GOMES, A.C.M.M.; MENDES, M.A.; COLOMBO, L.; CARNEIRO, V.T.C. *GID1* expression is associated with ovule development of sexual and apomictic plants. **Plant Cell Reporter**, 2017.

GALBIATI, F.; SINHA ROY, D.; SIMONINI, S.; et al. An integrative model of the control of ovule primordia formation. **The Plant Journal**, v. 76, n. 3, p. 446–455, 2013.

GALLEGO-GIRALDO, C.; HU, J.; URBEZ, C.; et al. Role of the gibberellin receptors *GID1* during fruit-set in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 79, p. 1020–1032, 2014.

GAO, X. H.; XIAO, S. L.; YAO, Q. F.; WANG, Y. J.; FU, X. D. An updated GA signaling “relief of repression” regulatory model. **Molecular Plant**, v. 4, n. 4, p. 601–606, 2011.

GOMEZ, M. D.; VENTIMILLA, D.; SACRISTAN, R.; PEREZ-AMADOR, M. A. Gibberellins regulate ovule integument development by interfering with the transcription factor *ATS1*. **Plant Physiology**, v. 172, n. December, p. 2403–2415, 2016.

GREENBOIM-WAINBERG, Y.; MAYMON, I.; BOROCHOV R.; et al. Cross talk between gibberellin and cytokinin: the *Arabidopsis* GA-response inhibitor *SPINDLY* plays a positive role in cytokinin signaling. **The Plant Cell**, v. 17, p. 92–102, 2005.

GRIFFITHS, J.; MURASE, K.; RIEU, I.; et al. Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. **The Plant cell**, v. 18, n. 12, p. 3399–3414, 2006.

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

GUPTA, R.; CHAKRABARTY, S. K. Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. **Plant Signaling & Behavior**, v. 2324, n. March, 2013.

HARTWECK, L. M.; OLSZEWSKI, N. E. Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. **The Plant cell**, v. 18, n. 2, p. 278–282, 2006.

HIRANO, K.; UEGUCHI-TANAKA, M.; MATSUOKA, M. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. March, p. 192–199, 2008.

HUANG, S.; CERNY, R. E.; QI, Y.; et al. Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 1270–1282, 2003.

HWANG, I.; SHEEN, J.; MÜLLER, B. Cytokinin signaling networks. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 353–380, 2012.

ISHIDA, T.; AIDA, M.; TAKADA, S.; TASAKA, M. Involvement of CUP-SHAPED COTYLEDON genes in gynoecium and ovule development in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol.**, v. 41, n. 1, p. 60–67, 2000.

JAMESON, P. E.; SONG, J. Cytokinin: a key driver of seed yield. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 593–606, 2016.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb . no Brasil. **Documentos 163**, p. 58 p., 2006.

KINOSHITA-TSUJIMURA, K.; KAKIMOTO, T. Cytokinin receptors in sporophytes are essential for male and female functions in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 1, p. 66–71, 2011.

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

Paulo.

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

KURAKAWA, T.; UEDA, N.; MAEKAWA, M.; et al. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. **Nature**, v. 445, n. February, p. 652–655, 2007.

KUROHA, T.; TOKUNAGA, H.; KOJIMA, M.; et al. Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. **The Plant cell**, v. 21, n. 10, p. 3152–3169, 2009.

LACERDA, A. L. M.; ALENCAR DUSI, D. M. DE; ALVES, E. R.; et al. Expression analyses of *Brachiaria brizantha* genes encoding ribosomal proteins *BbrizRPS8*, *BbrizRPS15a*, and *BbrizRPL41* during development of ovaries and anthers. **Protoplasma**, v. 250, n. 2, p. 505–514, 2013.

LEBLANC, O.; ARMSTEAD, I.; PESSINO, S.; et al. Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. **Plant Science**, v. 126, n. 1, p. 49–58, 1997.

LILJEGREN, S. J.; DITTA, G. S.; ESHED, Y.; SAVIDGE, B. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 404, n. April, p. 0–4, 2000.

LITUIEV, D. S.; KROHN, N. G.; MÜLLER, B.; et al. Theoretical and experimental evidence indicates that there is no detectable auxin gradient in the angiosperm female gametophyte. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 22, p. 4544–53, 2013.

LIU, Z.; FRANKS, R. G.; KLINK, V. P. Regulation of gynoecium marginal tissue formation by LEUNIG and AINTEGUMENTA. **The Plant Cell**, v. 12, n. October, p. 1879–1891, 2000.

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

MEINKE, D. W.; MEINKE, D. W.; CHERRY, J. M.; et al. *Arabidopsis thaliana*: a model

plant for genome analysis. **Science**, v. 662, n. 1998, 1998.

MIYAWAKI, K.; MATSUMOTO-KITANO, M.; KAKIMOTO, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. **The Plant Journal**, v. 37, p. 128–138, 2004.

MIYAWAKI, K.; TARKOWSKI, P.; MATSUMOTO-KITANO, M.; et al. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. **PNAS**, v. 103, p. 16598–16603, 2006.

NAKAJIMA, M.; SHIMADA, A.; TAKASHI, Y.; et al. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. **Plant Journal**, v. 46, n. 5, p. 880–889, 2006.

NEMHAUSER, J. L.; FELDMAN, L. J.; ZAMBRYSKI, P. C. Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis. **Development**, v. 127, p. 3877–3888, 2000.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. **Embryology of Angiosperms**, p. 475–518, 1984.

OLMEDO-MONFIL, V.; DURAN-FIGUEROA, N.; ARTEAGA-VAZQUEZ, M.; et al. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 628–632, 2010.

ORTIZ, J. P. A.; QUARIN, C. L.; PESSINO, S. C.; et al. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany**, v. 112, n. 5, p. 767–787, 2013.

OSTERLUND, T. Structure ± function relationships of hormone-sensitive lipase. **European Journal of Biochemistry**, v. 1907, p. 1899–1907, 2001.

PAGNUSSAT, G. C.; ALANDETE-SAEZ, M.; BOWMAN, J. L.; SUNDARESAN, V. Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. **Science**, v. 324, n. 5935, p. 1684–1689, 2009.

PODIO, M.; FELITTI, S. A.; SIENA, L. A.; et al. Characterization and expression analysis of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) genes in sexual and apomictic *Paspalum notatum*. **Plant Molecular Biology**, v. 84, n. 4–5, p. 479–495, 2014.

- R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; et al. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, v. 53, p. 745–757, 2003.
- RODRÍGUEZ-LEAL, D.; LEÓN-MARTÍNEZ, G.; ABAD-VIVERO, U.; VIELLE-CALZADA, J. Natural variation in epigenetic pathways affects the specification of female gamete precursors in *Arabidopsis*. **The Plant cell**, v. 27, n. April, p. 1034–1045, 2015.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- SCHMIDT, A.; WUEST, S. E.; VIJVERBERG, K.; et al. Transcriptome analysis of the *Arabidopsis* megaspore mother cell uncovers the importance of RNA Helicases for plant germline development. **PLoS Biol**, v. 9, n. 9, p. e1001155, 2011.
- SCHNEITZ, K.; HÜLSKAMP, M.; PRUITT, R. E. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. **The Plant Journal**, v. 7, n. 5, p. 731–749, 1995.
- SHIRASUNA, R. T. *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga. **Lista de espécies da flora do Brasil**. 2010. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2010.
- SILVA, P. I. T.; MARTINS, A. M.; GOUVEA, E. G.; PESSOA-FILHO, M.; FERREIRA, M. E. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics**, v. 14, p. 17, 2013.
- SILVEIRA, E. D.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARAES, L. A.; SILVA, F. R. DA; CARNEIRO, V. T. DE C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 84, 2009.
- SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; ALENCAR DUSI, D. M. DE; et al. 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 Reports**, v. 31, n. 2, p. 403–416, 2012.
- SONG, Y.; WANG, L.; XIONG, L. Comprehensive expression profiling analysis of *OsIAA* gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments. **Planta**, v. 229, n. 3, p. 577–591, 2009.
- SPILLANE, C.; CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis technology development—virgin births in farmers’ fields? **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 687–691, 2004.
- SU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, X. Auxin – Cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, v. 4, n. 4, p. 616–625, 2011.
- SUN, J.; NIU, Q.W.; TARKOWSKI, P.; et al. The *Arabidopsis AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 131, p. 167–176, 2003.
- SUN, T. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. **Plant physiology**, v. 154, n. 2, p. 567–570, 2010.
- SUZUKI, H.; PARK, S.; OKUBO, K.; et al. Differential expression and affinities of *Arabidopsis* gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. **The Plant Journal**, v. 60, p. 48–55, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; SUGIYAMA, T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 26405–26410, 2001.
- TUCKER, M. R.; ARAUJO, A. C. G.; PAECH, N. A.; et al. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **Plant Cell**, v. 15, p. 1524–1537, 2003.
- TUCKER, M. R.; OKADA, T.; HU, Y.; et al. Somatic small RNA pathways promote the

mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. **Development**, v. 140, p. 1399–1404, 2012.

UEGUCHI-TANAKA, M.; ASHIKARI, M.; NAKAJIMA, M.; et al. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 693–8, 2005.

VALLE, C. B. Forrageiras *Brachiaria* e/ou *Urochloa*: Dando nome as plantas. 2010. Portal dia de Campo.

VALLE, C. B. D.; MILES, J. W. Breeding of apomitic species. **Apomixis Newsletter**, v. 5, n. Special issue, p. 37–47, 1992.

VALLE, C. B. DO; 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; D. M. A. Dusi (Eds.); **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia** . v. 1, p.123 p, 2004. Brasília -DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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

WEISS, D.; ORI, N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. **Plant Physiology**, v. 144, p. 1240–1246, 2007.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; et al. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, v. 15, n. 11, p. 2532–2550, 2003.

WERNER, T.; SCHUMULLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 527–538, 2009.

YADEGARI, R.; DREWS, G. N. Female gametophyte development. **Plant Cell**, v. 16, n. suppl_1, p. S133-141, 2004.

YAMADA-AKIYAMA, H.; AKIYAMA, Y.; EBINA, M.; et al. Analysis of expressed sequence tags in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 7, p. 750–761, 2009.

YANG, W.C.; SHI, D.Q.; CHEN, Y.H. Female gametophyte development in flowering plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 89–108, 2010.

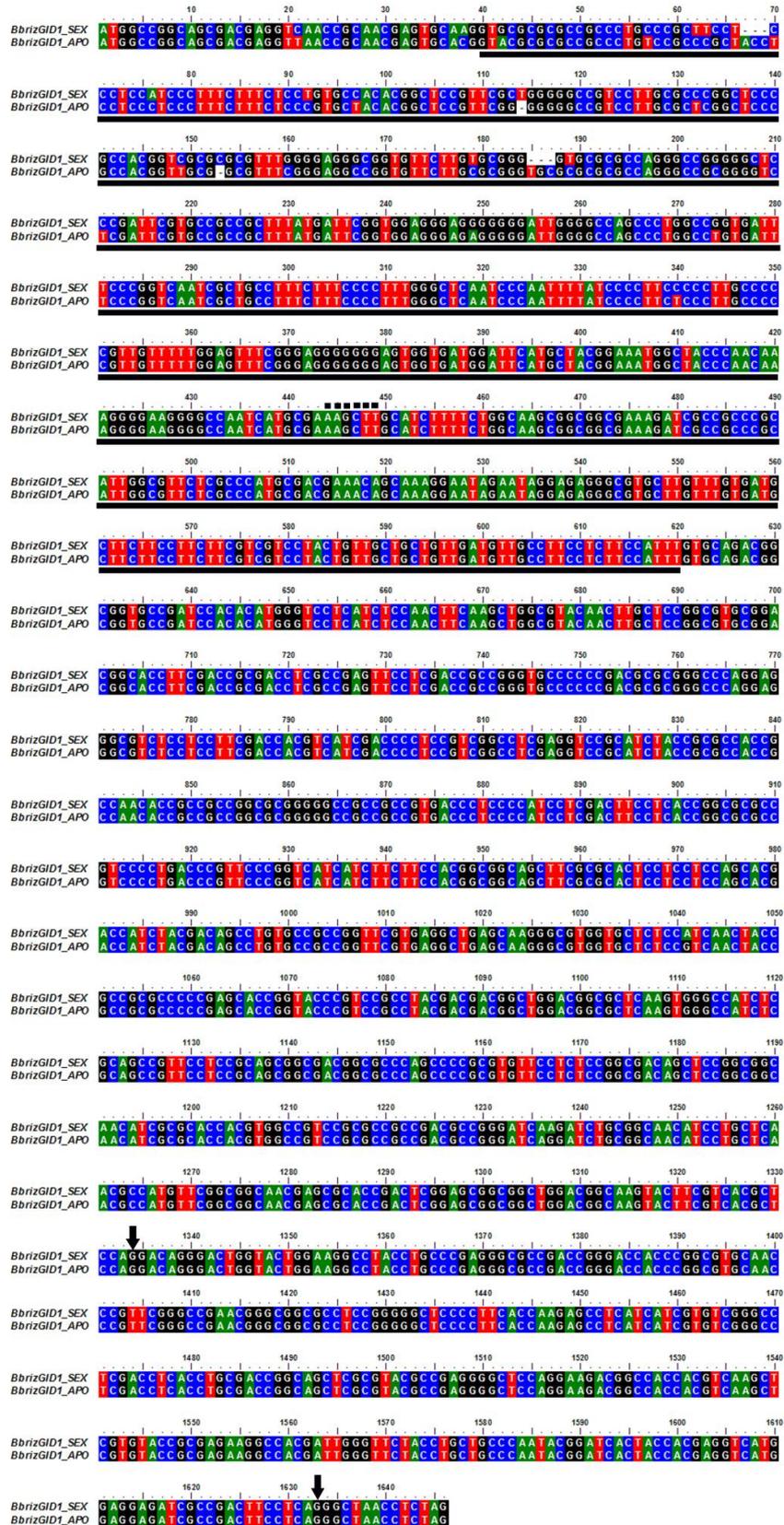
YONG-QIANG, A.; MCDOWELL, J. M.; HUANG, S.; et al. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **Plant Journal**, v.10, n.1, p.107-121, 1996.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 49–64, 2010.

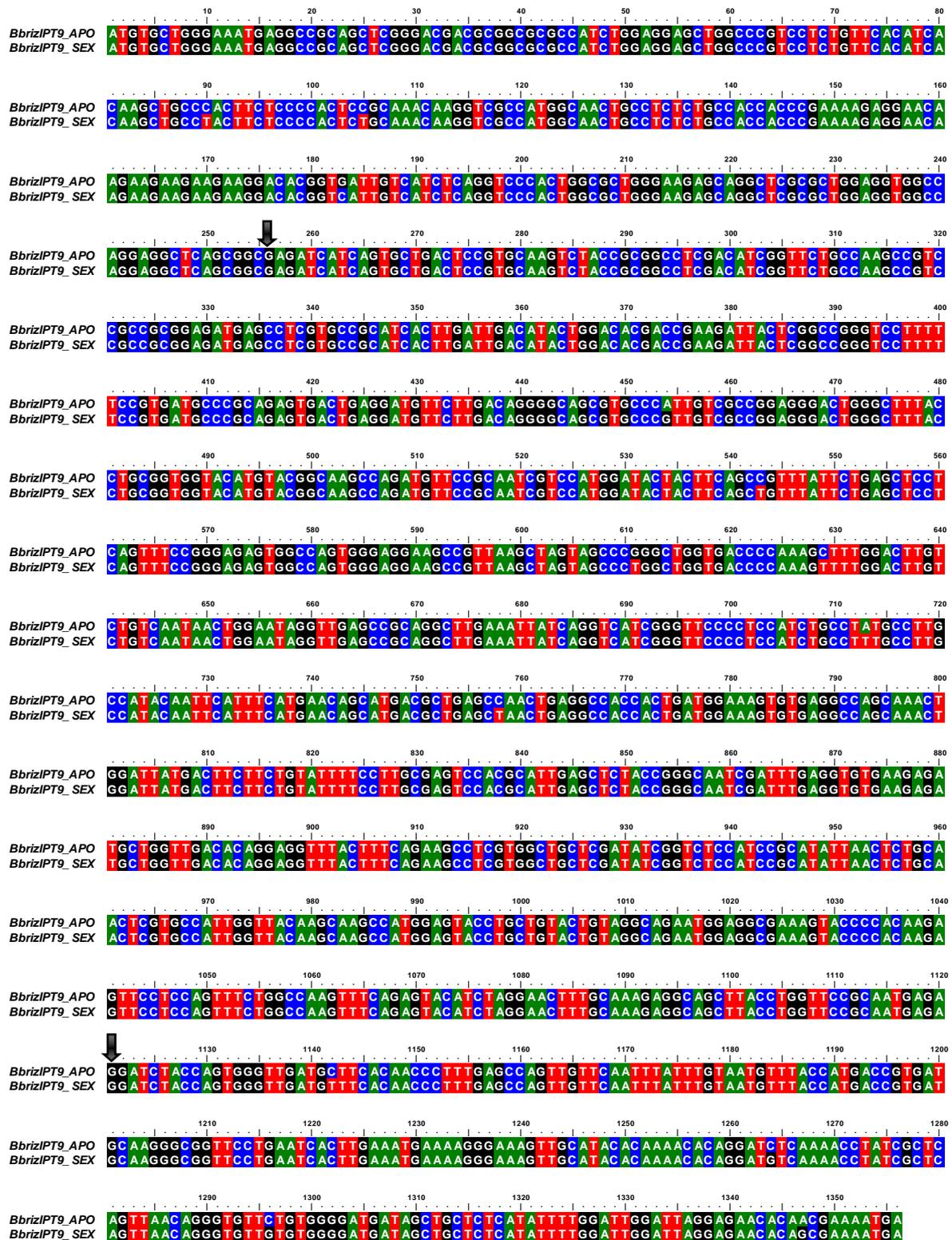
ZUBKO, E.; ADAMS, C.J.; MACHÁČKOVÁ, I.; et al. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. **The Plant Journal**, v. 29, p. 797–808, 2002.

APÊNDICES

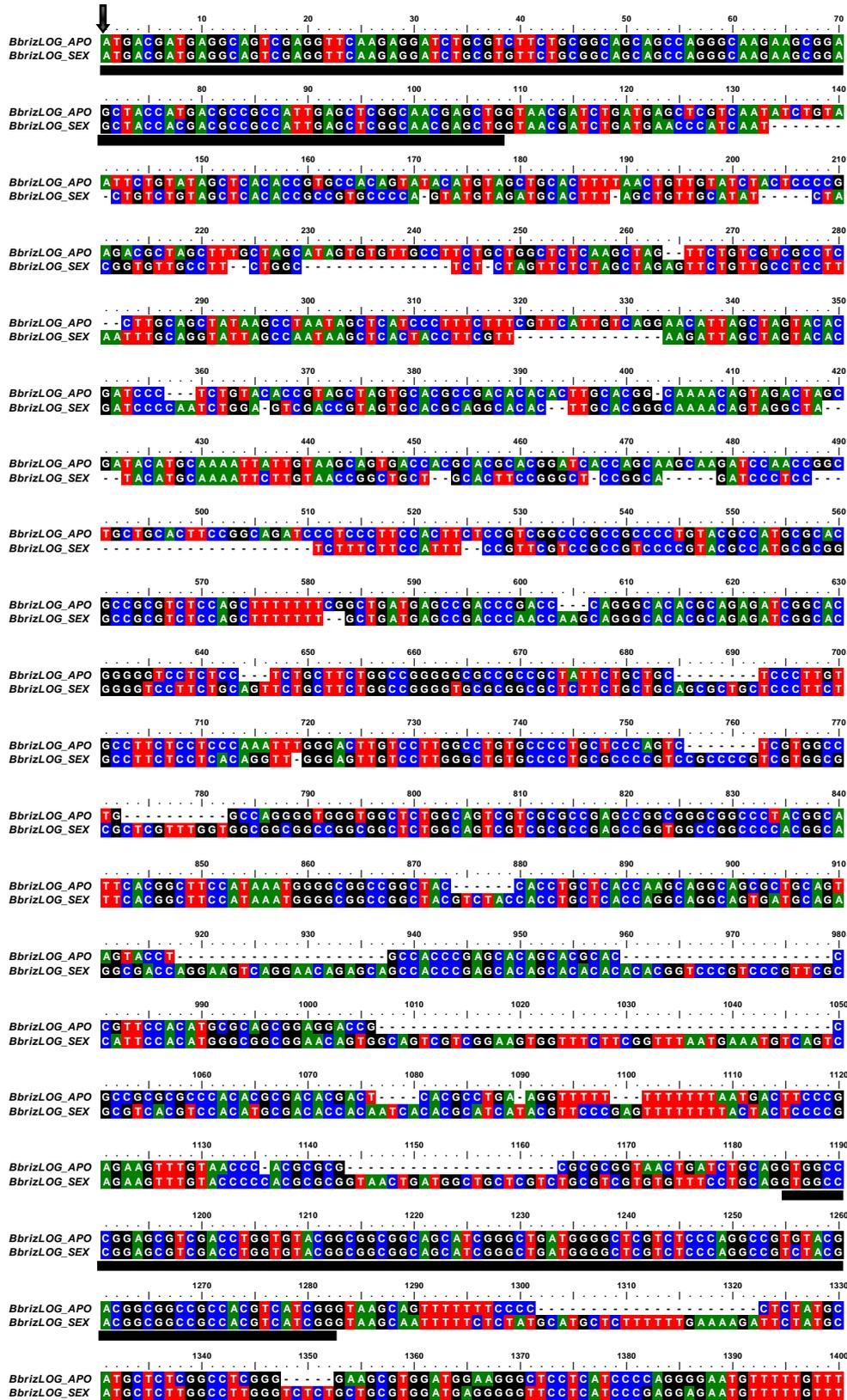
Apêndice A - Alinhamento da sequência genômica de *BbrizGID1* de plantas sexuais (SEX) e apomíticas (APO), por ClustalW. Os quadrados representam o sítio de restrição de *HindIII*. As setas indicam o início e o fim da região utilizada como sonda nas análises por *Southern Blot*. A região do íntron é indicada por uma barra preta.

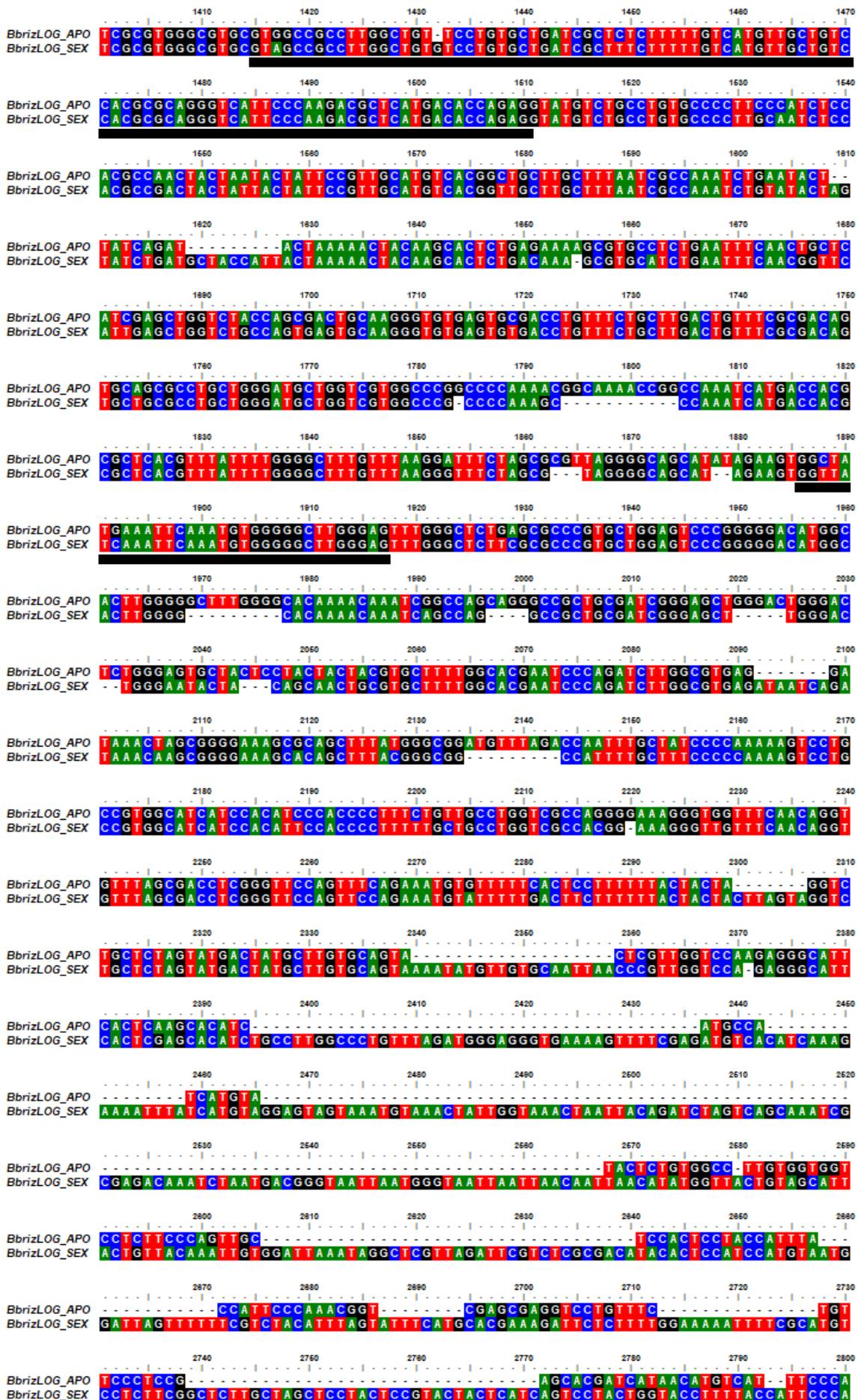


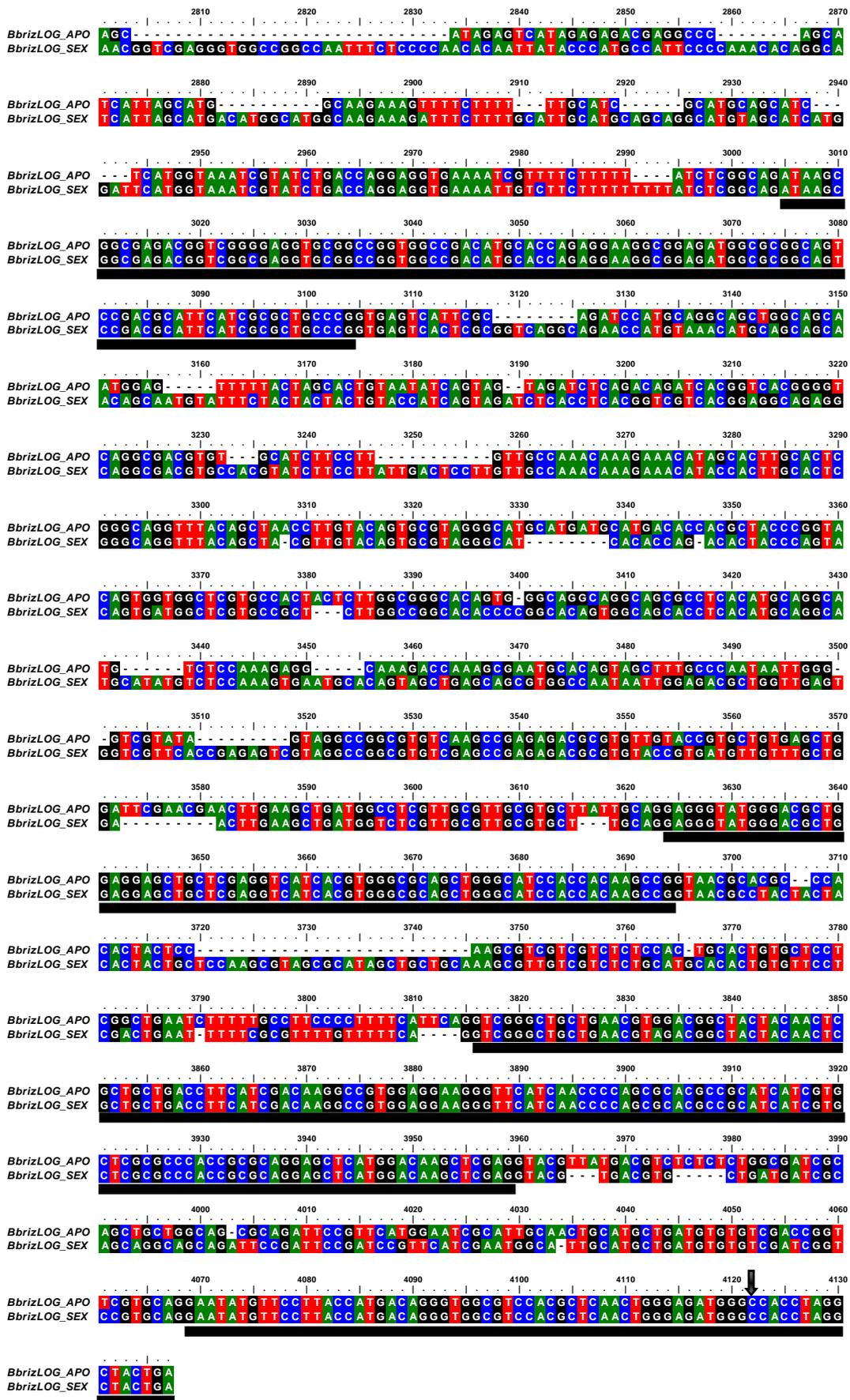
Apêndice B - Alinhamento das sequências genômicas de *BbrizIPT9* de plantas sexuais (SEX) e apomíticas (APO), por ClustalW. As setas indicam o início e o fim da região utilizada como sonda nas análises por *Southern Blot* e hibridização in situ. Neste gene não foi detectado a presença de íntrons.



Apêndice C - Alinhamento das seqüências genômicas de *BbrizLOG* de plantas sexuais (SEX) e apomíticas (APO). As setas indicam o início e o fim da região utilizada como sonda nas análises por *Southern Blot* e hibridização in situ. A região correspondente aos sete éxons foi indicada por uma barra preta.







Apêndice D - Tabela mostrando os dados obtidos pelas análises fenotípicas de três plantas de *Arabidopsis thaliana* de tipo selvagem e três linhagens transgênicas *pSTK::AtGID1a*, *p35S::AtGID1a* e a segunda geração de *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a*.

Plantas analisadas	Número total de óvulos analisados	Número de células semelhantes à CMM	Óvulos com células semelhantes à CMM por número total de óvulos (%)	Número de sementes por siliqua	Nível de expressão relativa
Wild-type_1	174	29	16.67	45.9	1
Wild-type_2	43	7	16.28	47.2	1.1
Wild-type_3	219	39	17.81	47.5	0.95
<i>p35S::AtGID1a_1</i>	116	38	32.76	55.3	2.2
<i>p35S::AtGID1a_2</i>	98	34	34.69	55.6	1.9
<i>p35S::AtGID1a_3</i>	50	15	30	55.5	2.5
<i>pSTK::AtGID1a_1</i>	183	63	34.43	54.8	1.62
<i>pSTK::AtGID1a_2</i>	28	10	35.71	55.2	1.7
<i>pSTK::AtGID1a_3</i>	114	36	31.58	54.4	1.6
<i>pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a_1</i>	89	26	29.21	*	*
<i>pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a_2</i>	207	57	27.54	*	*
<i>pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a_3</i>	93	26	27.97	*	*

*dados não observados.

Apêndice E – Versão completa do artigo intitulado: “**GID1 expression is associated to ovule development of sexual and apomictic plants**”.

GID1 expression is associated with ovule development of sexual and apomictic plants

Luciana Gomes Ferreira^{1,2} · Diva Maria de Alencar Dusi² ·
André Southernman Teixeira Irsigler² · Ana Cristina Meneses Mendes Gomes² ·
Marta Adelina Mendes³ · Lucia Colombo³ · Vera Tavares de Campos Carneiro^{1,2}

Received: 27 June 2017 / Accepted: 18 October 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract

Key message *BbrizGID1* is expressed in the nucellus of apomictic *Brachiaria brizantha*, previous to aposporous initial differentiation. *AtGID1a* overexpression triggers differentiation of *Arabidopsis thaliana* MMC-like cells, suggesting its involvement in ovule development.

Abstract GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1 (GID1) is a gibberellin receptor previously identified in plants and associated with reproductive development, including ovule formation. In this work, we characterized the *Brachiaria brizantha* GID1 gene (*BbrizGID1*). *BbrizGID1* showed up to 92% similarity to GID1-like gibberellin receptors of other plants of the Poaceae family and around 58% to GID1-like gibberellin receptors of *Arabidopsis thaliana*. *BbrizGID1* was more expressed in ovaries at megasporogenesis than in ovaries at megagametogenesis of both sexual and apomictic plants. In ovules, *BbrizGID1* transcripts were

detected in the megaspore mother cell (MMC) of sexual and apomictic *B. brizantha*. Only in the apomictic plants, expression was also observed in the surrounding nucellar cells, a region in which aposporous initial cells differentiate to form the aposporic embryo sac. *AtGID1a* ectopic expression in *Arabidopsis* determines the formation of MMC-like cells in the nucellus, close to the MMC, that did not own MMC identity. Our results suggest that GID1 might be involved in the proper differentiation of a single MMC during ovule development and provide valuable information on the role of GID1 in sexual and apomictic reproduction.

Keywords Apomixis · *Brachiaria brizantha* · Gibberellin · GID1 · Ovule development · Plant reproduction

Communicated by Xian Sheng Zhang.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00299-017-2230-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Vera Tavares de Campos Carneiro
vera.carneiro@embrapa.br

Luciana Gomes Ferreira
biolgf@yahoo.com.br

Diva Maria de Alencar Dusi
diva.dusi@embrapa.br

André Southernman Teixeira Irsigler
andre.irsigler@embrapa.br

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
ana.gomes@embrapa.br

Marta Adelina Mendes
martamendes86@gmail.com

Lucia Colombo
lucia.colombo@unimi.it

- 1 Department of Biology, University of Brasília-UnB, Campus Darcy Ribeiro S/N–Asa Norte, Brasília, DF 70910-900, Brazil
- 2 Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Parque Estação Biológica, PqEB Av. W5 Norte, Caixa Postal 02372, Brasília, DF 70770-917, Brazil
- 3 Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 26, 20133 Milan, Italy

germination, flowering and ovule development (Sun 2010; Gupta and Chakrabarty 2013; Gomez et al. 2016; Voegelé et al. 2011). The gibberellin receptor GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1 (GID1) and DELLA proteins, key negative regulators of gibberellins, act on the signal transduction pathway of gibberellin in *Arabidopsis thaliana* and rice (Griffiths et al. 2006; Ueguchi-Tanaka et al. 2005). The binding of gibberellin to the GID1 receptor causes a conformational change in the N-terminal extension of GID1, which inhibits gibberellin action (Sun 2010). The formation of the gibberellin–GID1–DELLA complex results in the rapid degradation of DELLA proteins, releasing the action of gibberellin by destabilizing and degrading DELLA proteins (Davière and Achard 2013; Hartweck and Olszewski 2006; Sun 2010). The GID1 gene was first identified in rice and encodes a protein with similarity to hormone-sensitive lipases (HSL) (Ueguchi-Tanaka et al. 2005). Overexpression analysis of GID1 in rice shows a hypersensitive phenotype to gibberellin, growing taller, containing long light-green leaves and with reduced fertility when compared with the control, while the *gid1* mutant presents insensitivity to gibberellin, suggesting that GID1 is the only gibberellin receptor in rice (Ueguchi-Tanaka et al. 2005). DELLA proteins participate in the correct formation of ovule integument and seed development in *Arabidopsis*, as shown in the *della global* mutant (the quintuple *gaiT6 rgaT2 rgl1-1 rgl2-1 rgl3-1* mutant). Short integuments and no distinction between the inner and outer cell layers of the integuments caused defects in the testa formation of *della global* mutant seeds. Moreover, the number of abortions increased and seed density per fruit was reduced (Gomez et al. 2016).

In angiosperms, ovule development starts with the formation of the ovule primordia from the placental tissue of the ovary. During early ovule development, a single sub-epidermal cell differentiates from the nucellus, leading to the formation of the megaspore mother cell (MMC). The inner and outer integuments begin to develop as the MMC undergoes meiosis, to give rise to four haploid megaspores. Three of them degenerate and the only one to survive becomes a functional megaspore, usually the one closest to the chalazal region. After three rounds of mitosis and cellularization, an embryo sac (ES) of the Polygonum-type, with three antipodal cells, a diploid central cell, two synergids, and one egg cell is formed, typical of plants of sexual reproduction (Schneitz et al. 1995; Grossniklaus and Schneitz 1998; Yang et al. 2010).

In *Brachiaria*, a genus of forage grass of the Poaceae family, reproduction may be sexual or asexual by apomixis, the latter resulting in progenies that are genetically identical to the mother plants (Carneiro et al. 2006). The apomictic reproduction by apospory predominates in these plants. In apospory, nucellar cells near the MMC differentiate into aposporous initial cells, which will undergo two mitosis

events to form unreduced ES of the Panicum-type, with a diploid central cell, two synergids, and one egg cell. The MMC degenerates during meiosis, or complete meiosis resulting in four megaspores, which will degenerate (Araujo et al. 2000; Dusi and Willemse 1999).

In *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*), a putative GID1-like gene of 606 nucleotides was previously detected by RNA-Seq analysis, as highly expressed in early stages of ovary development. In the model plant *Arabidopsis*, plant hormones were related to a fundamental role in the initiation of the ovule primordia and in the correct determination of the number of ovules (Bartrina et al. 2011; Cucinotta et al. 2014). Three genes were identified in these plants and considered as orthologous to the rice GID1, by a database search and gibberellin receptor activity of their encoded protein: *AtGID1a*, *AtGID1b* and *AtGID1c* (Nakajima et al. 2006). Functional analysis of double mutant plants *gid1a gid1b* showed reduced fertility; *gid1a gid1c* also reduced fertility and showed fruits with reduced length; *gid1b gid1c* did not show any phenotypic difference from wild-type plants (Gallego-Giraldo et al. 2014; Griffiths et al. 2006). The triple *gid1a gid1b gid1c* mutant showed to be extremely dwarf-sized and was insensitive to gibberellin, resulting in complete infertility. These results suggest that GID1 is the only gibberellin receptor in *Arabidopsis* and that this gene participates in reproductive development (Griffiths et al. 2006). The expression patterns of the three genes of *Arabidopsis* at anthesis, characterized using *pAtGID1::AtGID1-GUS* fusion constructs, showed a GID1a expression signal in all tissues, mainly surrounding the ES; GID1b only appeared in the chalaza region of the ovule and GID1c only in valves, with no expression in ovules (Gallego-Giraldo et al. 2014). Phenotypic traits of the *gid1-1* rice mutant, such as dwarf phenotype and insensitivity to gibberellin, were restored to normal with the overexpression of *AtGID1a*, *AtGID1b* and *AtGID1c* (Nakajima et al. 2006), showing the conserved nature of GID1 in these species. In *Arabidopsis*, the role of GID1 is associated with seed-set and fruit growth (Gallego-Giraldo et al. 2014); however, the role of GID1 during ovule development is still unclear. Studies related to GID1 might contribute to clarifying the mechanisms underlying the action of gibberellin in ovule development, as well as its participation in the early differential ES development of sexual and apomictic plants.

Our study aimed to evaluate the expression of GID1 during ovary development and, particularly, in the onset of ES of sexual and apomictic plants. The *B. brizantha* gene, named *BbrizGID1*, showed higher expression during ovule development at megasporogenesis. We detected *BbrizGID1* transcripts in the MMC of sexual and apomictic *B. brizantha* and in the surrounding nucellar cells of the apomicts. In an attempt to mimic *BbrizGID1* expression in *Arabidopsis* ovules, we investigated the results of overexpressing

AtGID1a under the control of the ovule-specific SEED-STICK promoter (pSTK) (Kooiker et al. 2005) and the 35S constitutive promoter of Cauliflower mosaic virus (p35S) (Benfey et al. 1990). Morphological characterization of reproductive organs, in particular ovules, in the transformed plants suggested that *AtGID1a* is involved in the differentiation of additional MMC-like cells from nucellar cells near the MMC and in the integument development, suggesting either a delayed megasporogenesis or an earlier growth of integuments in the transgenic plants. Our findings on the *GID1* expression during ovule development provide valuable information on the role of *GID1* in the ovule development of sexual and apomictic plants.

Materials and methods

BbrizGID1 sequence analysis

To verify the similarity of the *BbrizGID1* sequence previously identified in RNA-Seq libraries of sexual and apomictic ovaries of *B. brizantha*, basic local alignment search tool (BLAST) (Altschul et al. 1990, 1997) was performed against the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database. BLASTn and BLASTx were used to compare nucleotides and translated sequences, respectively. Sequences showing the most significant nucleotide and amino acid sequence homology were used in multiple sequence alignments with ClustalW2 (Chenna et al. 2003). The cutoff *e* value of $> 2e^{-57}$ and identity above 90% was used to define homologs. The Arabidopsis Information Resource database (TAIR, <http://arabidopsis.org>) was also used for comparative analyses between the *BbrizGID1* sequence and the sequences from the *Arabidopsis* model plant. The genomic sequences of *BbrizGID1* from sexual and apomictic genotypes were obtained searching genomic libraries under construction. Restriction map analysis of *BbrizGID1* from sexual and apomictic genomes was performed with Webcutter 2.0.

Plant material

Two accessions of *B. brizantha* from Embrapa's germplasm collection, grown in the field, were used in this work: BRA 002747, a sexual diploid ($2n = 2x = 18$), and BRA 000591, a facultative apomictic tetraploid ($2n = 4x = 36$) named *B. brizantha* cv. Marandu, with 98% of apospory (Araujo et al. 2007). Ovaries and anthers of both accessions were dissected from flowers of different plants before anthesis (I, II, III and IV), at different stages of development, under a Zeiss Stemi SV11 stereomicroscope. Ovaries at stages I and II contain ovules in megasporogenesis, whereas stages III and IV contain ovules in megagametogenesis (Araujo et al.

2000). The occurrence of nucellar cells and MMC characterizes ovules at stage I, in both sexual and apomictic plants. At stage II, pistils present ovules with degenerated tetrads, and in apomictic plants, aposporous initials can be visualized. At stage III, ovules with coenocytes are observed. Ovaries at stage IV contain mature ES, before anthesis (Araujo et al. 2000; Rodrigues et al. 2003). *Arabidopsis* wild-type (ecotype Columbia) and the *pAtGID1a::AtGID1a-GUS*, *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* and *pAtGID1c::AtGID1c-GUS* transgenic lines (Gallego-Giraldo et al. 2014; Suzuki et al. 2009), provided by Dr. Perez-Amador, were cultivated in a growth room at 22 °C under long-day (16 h light per 8 h dark) conditions.

Southern hybridization analysis

Genomic DNA was extracted from young leaves of *B. brizantha* using a Dellaporta procedure (Dellaporta et al. 1983) modified by Leblanc et al. (1997). To estimate the copy number of *BbrizGID1*, 30 µg of genomic DNA from each genotype was digested with *EcoRI*, *HindIII* and *XbaI* at 2.5 U/µg of DNA. A 300 bp fragment PCR amplified with the primers GGACAGGGACTGGTACTGGAAG and CTGAGGAAGTCGGCGATCTC for *BbrizGID1* without internal restriction sites for the enzymes used to digest the genomic DNA was used as probe. Labeling the probe with ^{32}P - αdCTP , hybridization and radioactive detection assays were performed as described (Sambrook and Russell 2001). The hybridized membrane was placed in the cassette containing Imaging Plate (IP) and the image generated on the device Phosphorimager™ FUJIFILM FLA-3000 SERIES, using the Image Reader FLA-3000 V1.8 series programs and image display by Multi Gauge V3.0.

RNA isolation and RT-qPCR analyses

In sexual and apomictic *B. brizantha* plants, total RNA was extracted in three biological replicates, each constituted of a pool of 250 ovaries, at each of the four stages, using TRIZOL® (Invitrogen) as previously described (Rodrigues et al. 2003). Reverse transcriptase reaction was performed with SuperScript III (Invitrogen) and 2 µg of RNA according to the manufacturer's protocol. RT-qPCRs were done using SYBR Green PCR Master Mix Green (Applied Biosystems). Oligonucleotide pairs for *BbrizGID1* were designed using Primer 3.0 program (Rozen and Skaletsky 2000): forward (TCAAGCTCGTGTACCGCGAG) and reverse (CTGAGG AAGTCGGCGATCTC). The analysis of data was performed by the method $\Delta\Delta\text{Ct}$, with *BbrizUBCE* as reference gene, encoding the ubiquitin (forward GGTCTTGCTCTC CATCTGCT) and (reverse CGGGCTGTCGTCTCATAC TT), as previously used (Silveira et al. 2009).

In *Arabidopsis* plants, total RNA was extracted from 1 to 2 inflorescences in three biological replicates of *pSTK::AtGID1a* transgenic plants and *p35S::AtGID1a* transgenic plants, using NucleoZOL[®] (Macherey–Nagel) according to the manufacturer's instructions. The total RNA was incubated with the Ambion TURBO DNA-free DNase (Invitrogen) and then reverse transcribed using the ImProm-II[™] reverse transcription system (Promega). Oligonucleotide pairs were designed using Primer 3.0 program for *AtGID1a* forward (GCTGCGAGCGATGAAGTT) and reverse (GAT TGGCGTTTGCAGTGA), *UBIQUITIN10* forward (CTG TTCACGGAACCCAATTC) and reverse (GGAAAAAGG TCTGACCGACA), and *ACTIN2-8* forward (CTCAGGTAT TGCAGACCGTATGAG) and reverse (CTGGACCTGCTT CATCATACTCTG). *UBIQUITIN10* and *ACTIN2-8* genes were used as references and gene expression analysis was performed using the iQ5 Multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad) with SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad). The assay was conducted in three technical replicates of each of the three different biological replicates for each sample.

Expression analysis by in situ hybridization

The RNA probe was synthesized using the DIG RNA labeling kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. The same PCR fragment of 300 bp from *BbrizGID1* located in the 3' region, flanked by positions 1334–1633 of the nucleotide sequence, was used as a probe. The *BbrizGID1* fragment was cloned into pGEM-T Easy Vector System I (Invitrogen) and used as a template for in vitro transcription with SP6 and T7 polymerases, used as sense and antisense probes, respectively. In situ hybridization was performed in semi-thin sections of 3.5 μm of ovaries at megasporogenesis of sexual and apomictic plants. The sample preparation and in situ hybridization were carried out as previously described (Alves et al. 2007; Silveira et al. 2012). Hybridized sections were observed with a Zeiss Axiophot light microscope.

Construction of vectors and transformation of *Arabidopsis* plants

The full-length *Arabidopsis AtGID1a* gene was cloned using the Gateway system (Invitrogen) and the primers ATGGCT GCGAGCGATGAA and TTAACATTCCGCGTTTAC AAAC. The promoters of the SEEDSTICK gene, *pSTK* (Kooiker et al. 2005), to drive the expression in ovules, and the 35S constitutive promoter of the Cauliflower mosaic virus (*p35S*) (Benfey et al. 1990) were used. Plants of *Arabidopsis* ecotype Columbia were transformed with *p35S::AtGID1a* and *pSTK::AtGID1a* constructs by floral dip method (Clough and Bent 1998). The *pSTK::AtGID1a* transformant lines from the ecotype Columbia were selected

using BASTA, and *p35S::AtGID1a* transformant lines from the ecotype Columbia were selected using kanamycin. The *pKNU:nlsYFP Arabidopsis* line (Tucker et al. 2012) provided by Dr. Tucker was also transformed with *p35S::AtGID1a* by floral dip method (Clough and Bent 1998). The transformant lines were selected using kanamycin.

GUS expression analysis

The *pAtGID1a::AtGID1a-GUS*, *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* and *pAtGID1c::AtGID1c-GUS* lines (Gallego-Giraldo et al. 2014; Suzuki et al. 2009) were analyzed at different stages of the ovule development. β -Glucuronidase (GUS) assays were performed on inflorescences overnight at 37 °C, as previously described (Liljegren et al. 2000). Samples were incubated in a clearing solution of chloral hydrate:glycerol:water (8:1:2; w/v/v), dissected and observed by DIC microscopy.

Morphological analysis of *Arabidopsis* flowers by DIC microscopy

Flowers at different developmental stages were collected, fixed with 9:1 ethanol:acetic acid and cleared overnight using clearing solution. After clearing, ovules were dissected from premature pistils on a slide using a stereomicroscope, mounted with a cover slip, and subsequently observed using a Zeiss Axiophot D1 microscope equipped with DIC optics. Images were captured on an Axiocam MRc5 camera (Zeiss) using the Axiovision program (version 4.1). Three different plants of wild-type (ecotype Columbia) and three independent events of each transformant line *p35S::AtGID1a*, *pSTK::AtGID1a* and the second generation of *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a* line were analyzed. Three independent events of *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a* line were observed with a Zeiss Axiophot microscope using a filter with 475/40 nm laser line for excitation. Emissions were detected between 530/40 nm. Images were captured on an Axiocam MRc5 camera (Zeiss) using the Axiovision program (version 4.1).

Results

BbrizGID1 encodes a protein with similarity to the GID1 gibberellin receptor

Previous RNA-Seq analysis pointed to a sequence of 606 nucleotides similar to the *GID1-like* gene from different plants. This sequence was present in both genomic libraries and was named *BbrizGID1*. Genomic libraries of sexual and apomictic *B. brizantha* (unpublished results) were screened and a full-length DNA sequence, constituted of 1646 nucleotides (Supplementary Fig. S1) and coding 352 amino acids

(Fig. 1), was found in this analysis. The *BbrizGID1* consists of two exons and one intron, similar to the *GID1* structure from rice (Ueguchi-Tanaka et al. 2005). The predicted amino acid sequences of *BbrizGID1* from sexual and apomictic plants have the same number of amino acids, differing in two amino acids at positions 152 and 217. In position 152, an isoleucine (I) found in sexual plants is replaced by a valine (V) in apomicts. In position 217, a lysine (K) from sexual plants is replaced by an arginine (R) in apomicts (Supplementary Fig. S2).

To analyze the similarity of *BbrizGID1* with *GID1* sequences from other plants, an NCBI database search was performed. The *BbrizGID1* predicted amino acid sequence showed similarity to the sequences of *GID1*-like gibberellin receptors of other plants of the Poaceae family (Fig. 1). The most similar sequences were from the following plants (with respective percentage identity): *Setaria italica* (92%), *Sorghum bicolor* (91%), *Saccharum officinarum* (90%), *Zea mays* (87%), *Brachypodium distachyon* (86%), *Oryza sativa Japonica Group* (84%) and *Hordeum vulgare* (83%). The similarity of *BbrizGID1* to the three *Arabidopsis* genes was very close: *AtGID1c* (58%), *AtGID1a* (57%) and *AtGID1b* (55%). Alignment also showed the presence of the consensus sequence of the HSL family, including the conserved HSL motifs HGG and GX SXG in *BbrizGID1* (Fig. 1). The *BbrizGID1* deduced amino acid sequence showed two conserved catalytic centers with the HSL sequence, serine (S) and aspartic acid (D), whereas another catalytic center, histidine (H), was replaced by isoleucine (I) (Supplementary Fig. S3).

BbrizGID1* is present in the sexual and apomictic genotypes of *B. brizantha

In the apomictic genotype of *B. brizantha*, the Southern blot displayed three fragments after *EcoRI* DNA digestion, four after *HindIII* and two after *XbaI*. In the sexual genotype, one fragment hybridized after *EcoRI* DNA digestion, three after *HindIII* and two after *XbaI* (Fig. 2). Restriction map analysis of genomic DNA from both genotypes (Supplementary Fig. S1) showed that there is no site for *EcoRI* and *XbaI* and a site for *HindIII* is found at the intron region, position 444. The probe hybridization site is between positions 1334 and 1633 from the exon region of the nucleotide sequence. Genomic hybridization confirmed that *BbrizGID1* is present in both sexual and apomictic genotypes in a different restriction pattern.

***BbrizGID1* expression in ovaries of sexual and apomictic plants is higher during megasporogenesis**

Analysis of *BbrizGID1* expression profile from the RNA-Seq data of ovaries of sexuals and apomicts suggested higher

expression of *BbrizGID1* in ovaries at megasporogenesis stage than in ovaries at megagametogenesis stage (data not shown). To confirm these results, the transcript levels of *BbrizGID1* were compared quantitatively in ovaries of sexual and apomictic plants (Fig. 3), using pistils of *B. brizantha* in four different stages of development as previously described (Araujo et al. 2000; Rodrigues et al. 2003). Ovaries from pistils in stage I, corresponding to the onset of megasporogenesis, showed higher expression of *BbrizGID1*, whereas *BbrizGID1* expression decreased in the later developmental stages. At the 5% significance level, analysis of deviance (ANODEV) test showed that sexual and apomictic reproduction modes do not interfere with *BbrizGID1* expression ($F=0.903$, $GL=19$, $GL=1$, $p=0.353$), but there are significant differences between stages I, II and III of ovule development in both plants ($F=49.66$, $GL=19$, $GL=3$, $p=0.0001$). Comparison of *BbrizGID1* expression in stages III and IV, however, did not show a significant difference.

***BbrizGID1* is expressed in MMC of sexual and apomictic *B. brizantha* and in nucellar cells of apomicts**

In situ hybridization of *BbrizGID1* was performed in the early stages of ovule development of sexual and apomictic plants to understand the cellular localization of *BbrizGID1* within the initial events of ovule development (Fig. 4). The antisense probe of *BbrizGID1* in the early stages of megasporogenesis resulted in high signal of hybridization in MMC of sexual (Fig. 4a, b) and apomictic plants (Fig. 4d, e). Nucellar cells in sexual ovules showed weak signal in comparison to the strong expression of *BbrizGID1* in the nucellar cells of apomicts (Fig. 4d, e). In sexual and apomictic plants, a weak signal was detected in inner and outer integuments (Fig. 4a, d). The sense control probe did not show any hybridization signal in sexual and apomictic ovules, as expected (Fig. 4c, f).

GID1* proteins show specific spatial expression patterns in *Arabidopsis

To study the localization of *GID1* (a, b, c) proteins during the first stages of ovule development, transgenic *Arabidopsis* lines carrying *pAtGID1::AtGID1-GUS* translational fusions (Gallego-Giraldo et al. 2014; Suzuki et al. 2009) were analyzed (Fig. 5). As visualized in the GUS assay, *GID1a* is present in the whole pistil during early development, before anthesis (Fig. 5a). The GUS signal was strongly detected in the inner and outer integuments of the ovules, at 2-III stage, in which MMC is in meiosis, and the inner and outer integuments already developing (Schneitz et al. 1995), of *pAtGID1a::AtGID1a-GUS* line. No signal was detected in MMCs and nucellar cells (Fig. 5b). The GUS signal was

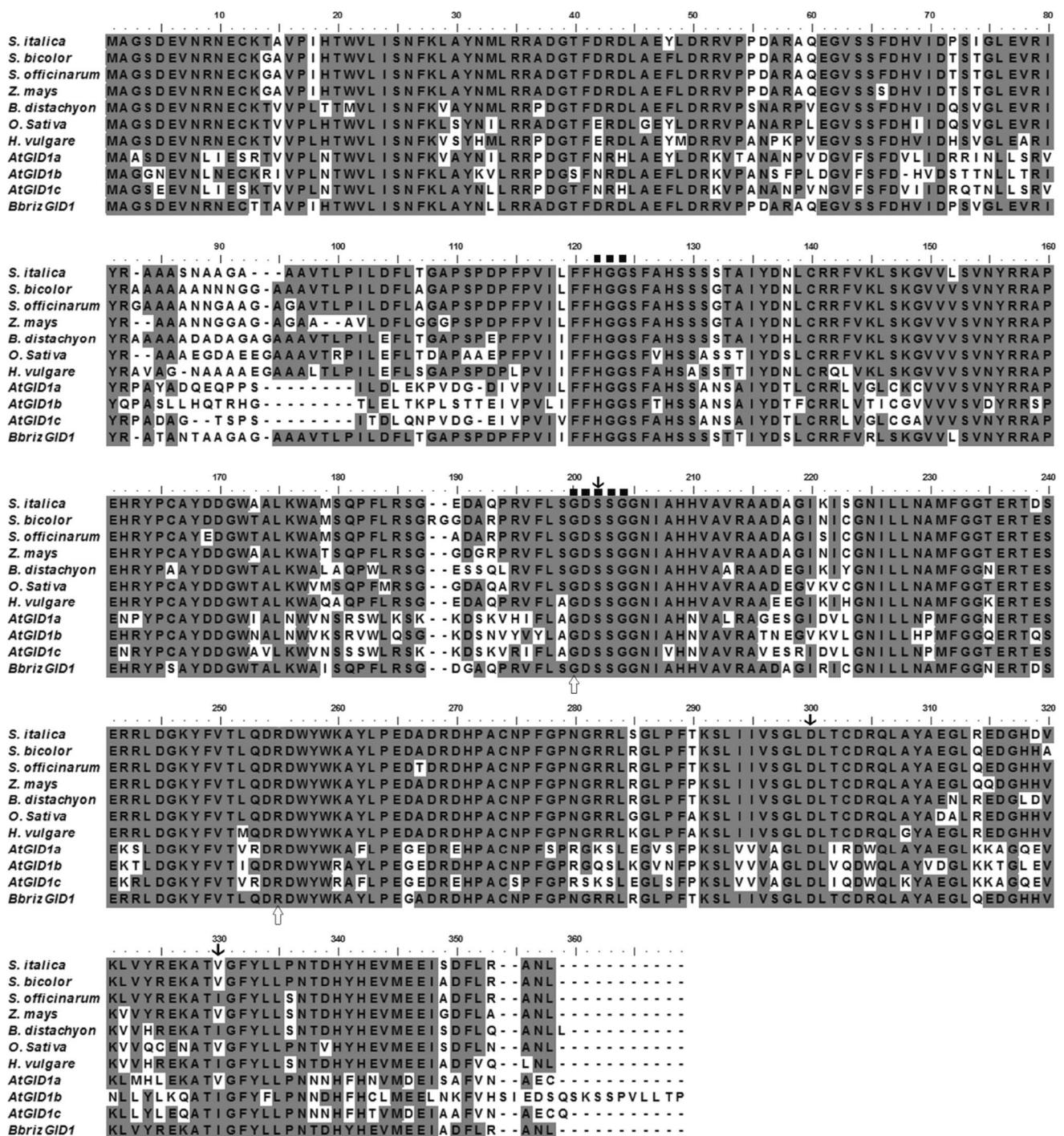


Fig. 1 Multiple sequence alignment by ClustalW of *BbrizGID1* sequence, from the apomictic plants, showing the *Arabidopsis thaliana* and the most similar sequences found: *Setaria italica* (Accession Number XP_004962116.1), *Sorghum bicolor* (XP_021303311.1), *Saccharum officinarum* (CAP64326.1), *Zea mays* (CAP64327.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003568469.1), *Oryza sativa* japonica group (XP_015639961.1), *Hordeum vulgare* (CAO98733.1), *AtGID1a* (At3g05120), *AtGID1b* (At3g63010) and *AtGID1c* (At5g27320). Gray highlight shows the amino acid residue conserved

amongst the sequences. Squares represent regions identified as conserved within the hormone-sensitive lipase (HSL) family, HGG and GX SXG motifs. Black arrows show the three catalytic centers, serine (S), aspartic acid (D), and isoleucine (I), which replace histidine (H), characteristic of the HSL family in all the *GID1* sequences of the Poaceae plants. Numbers indicate the position from the start codon. White arrows indicate glycine (G) and arginine (R) residues that are essential for maintaining the gibberellin binding activity in rice (Ueguchi-Tanaka et al. 2005)

Fig. 2 Genomic DNA analysis of apomictic (APO) and sexual (SEX) *Brachiaria brizantha* digested with *EcoRI* (E); *HindIII* (H) and *XbaI* (X). **a** Electrophoresis in 0.8% agarose gel in **b** fragments hybridized in Southern blot analysis with a *BbrizGID1* ³²P-labeled probe. In APO three fragments were displayed after *EcoRI* DNA digestion, four after *HindIII* digestion and two after *XbaI* digestion. In SEX, one fragment was hybridized after *EcoRI* digestion, three after *HindIII* and two fragments after *XbaI* digestion. Image was generated on a phosphor imaging plate. C as control, the same fragment used to synthesize the probe

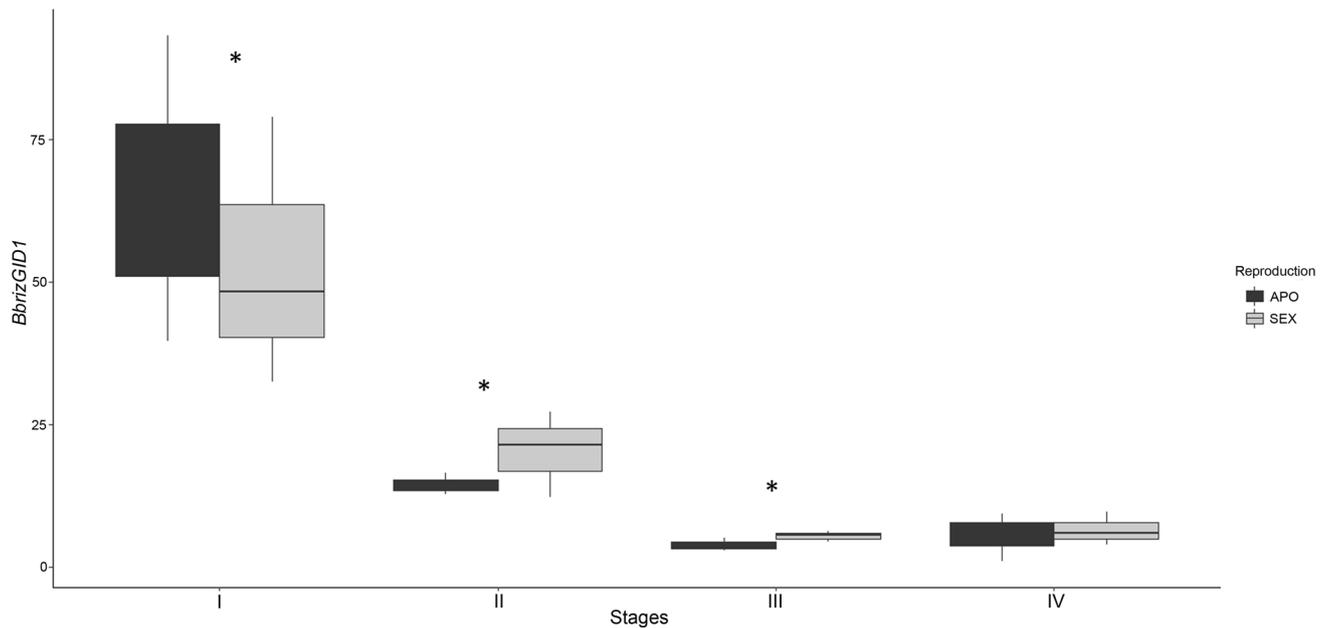
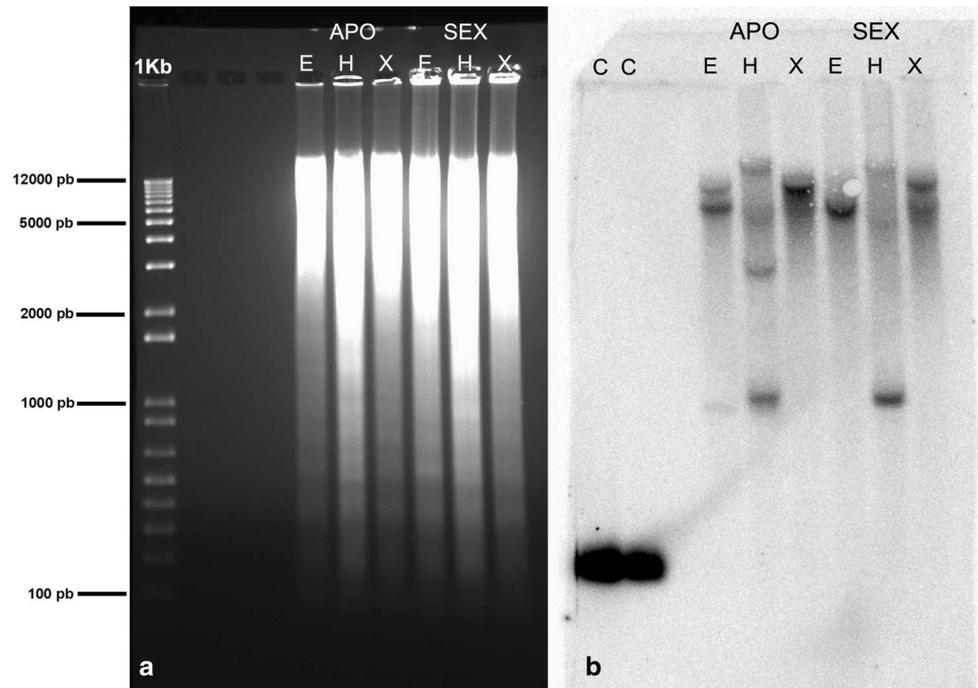


Fig. 3 Boxplot showing the relative expression levels of the *BbrizGID1* by RT-qPCR in *Brachiaria brizantha*. Analysis in developing ovaries before anthesis at megasporogenesis (stages I, II) and megagametogenesis (stages III and IV) of apomictic (APO) and sexual (SEX) plants. Bars represent standard deviation based on the

mean of three biological samples. The mean quartiles, median and ANODEV were calculated in the R Core Team (2016) program. The significant differences between stages of ovary development are marked with asterisks ($*p < 0.05$)

present throughout the mature ovule, including the ES and the integuments (Fig. 5c). In the *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* line GUS signal was localized in the inner and outer integuments at 2-III-2-V stage (Schneitz et al. 1995) and no

signal was detected in MMCs and nucellar cells (Fig. 5d, e). In mature ovules, at the FG7 stage in which the ES is formed, the GUS signal was localized mainly in the chalaza zone, at the base of the ES (Fig. 5f). *AtGID1c* was expressed

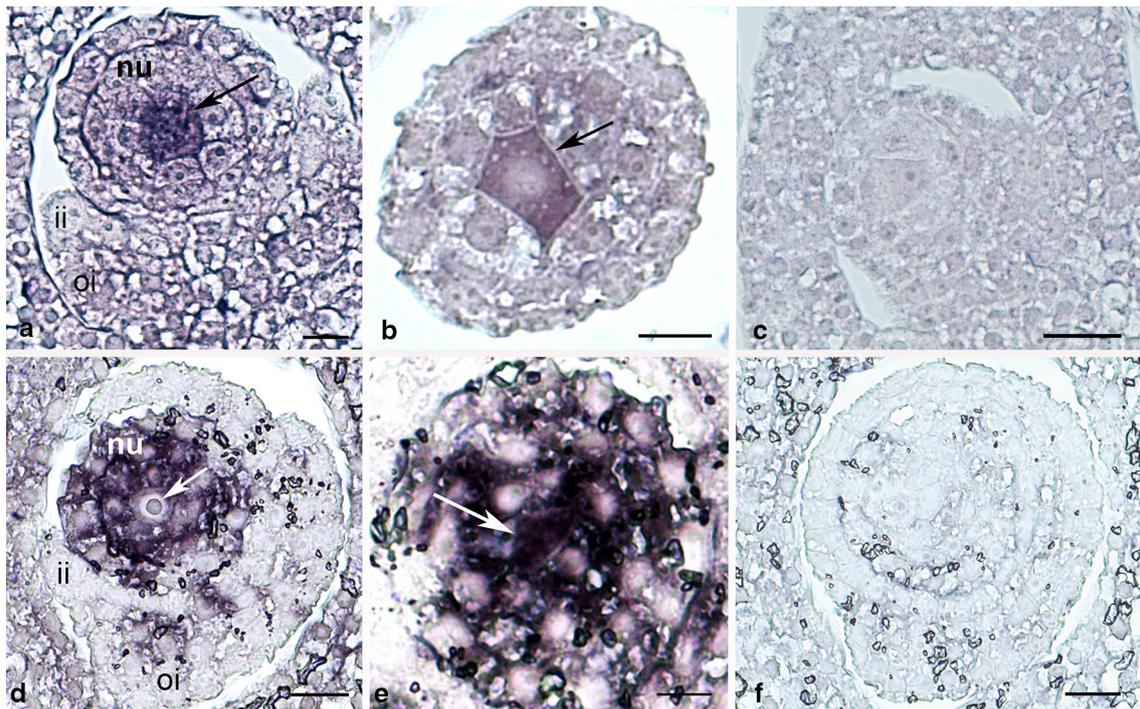


Fig. 4 Localization of *BbrizGID1* expression by in situ hybridization in semi-thin sections of ovaries of *Brachiaria brizantha* sexual (**a–c**) and apomictic (**d–f**) plants. **a** Ovule with labeling in the megaspore mother cell (arrow) with weaker signal in the nucellar cells (nu), inner (ii) and outer (oi) integuments. **b** Detail of the megaspore mother cell (arrow) with strong signal of hybridization. **c** Control

with sense probe showing no signal. **d** Detail of the ovule with labeling in the nucellar cells (nu) and the megaspore mother cell (arrow) with weaker signal in the inner (ii) and outer (oi) integuments. **e** Next section of the anterior ovule showing the cytoplasm of the megaspore mother cell (arrow). **f** Control with sense probe showing no signal. Scale bars **a** 12 μm , **b** 10 μm , **c** 20 μm and **d–f** 10 μm

specifically in the septum, but was completely absent in the ovules at 2-III stage and funiculi of *pAtGID1c::AtGID1c-GUS* line (Fig. 5g, h). *GUS* expression was not observed in ovules.

Phenotypic characteristics of *Arabidopsis* overexpressed *AtGID1a* lines are distinct from wild-type

To study whether ectopic *AtGID1a* was sufficient to determine the formation of MMC-like cell we have transformed *Arabidopsis* plants with *p35S::AtGID1a* and *pSTK::AtGID1a*. *pSTK* is specifically active during ovule development starting from stage I (Brambilla et al. 2008). We analyzed three transgenic plants containing *p35S::AtGID1a* and three containing *pSTK::AtGID1a* by RT-qPCR. Results showed that *AtGID1a* expression was higher in the inflorescences of plants from both groups of transgenic lines compared to wild-type plants (Supplementary Fig. S4). The early stages of ovule development of these transgenics were analyzed, especially the finger-like (2-I) stage, in which MMC is formed (Schneitz et al. 1995) and additional MMC-like cells were observed (Fig. 6). The *pSTK::AtGID1a* and *p35S::AtGID1a* plants showed asynchrony in development of the inner and outer

integuments as regards megasporogenesis events if compared with wild-type (Fig. 6). These results suggest that ectopic expression of *AtGID1a* could interfere with proper integument development. The additional MMC-like cells of overexpressed *AtGID1a* plants were observed only in ovules at the finger-like stage (2-I). In later stages of development, only one functional megaspore was observed, suggesting that only one MMC completed the meiotic division and entered the gametogenesis process, as twin ES were not observed during the analysis of mature ovules. Results of the phenotype analysis of wild-type *Arabidopsis* and three lines of *pSTK::AtGID1a*, *p35S::AtGID1a* were evaluated for each plant (Supplementary Table S1). In ovules of wild-type *Arabidopsis*, additional MMC-like cells were also observed but in a reduced number, 17% of the total number of ovules analyzed. In transgenic plants, additional MMC-like cells were observed in 33 and 32% of the total number of ovules analyzed using *pSTK* or *p35S* promoter, respectively (Fig. 7). Statistical analysis (t test) showed that there is a significant difference between the number of additional MMC-like cells in the overexpressed *AtGID1a* lines compared to wild-type, independent of the promoter used for *AtGID1a* expression, *pSTK* ($p=0.009$) or *p35S* ($p=0.013$). In *pSTK::AtGID1a* and

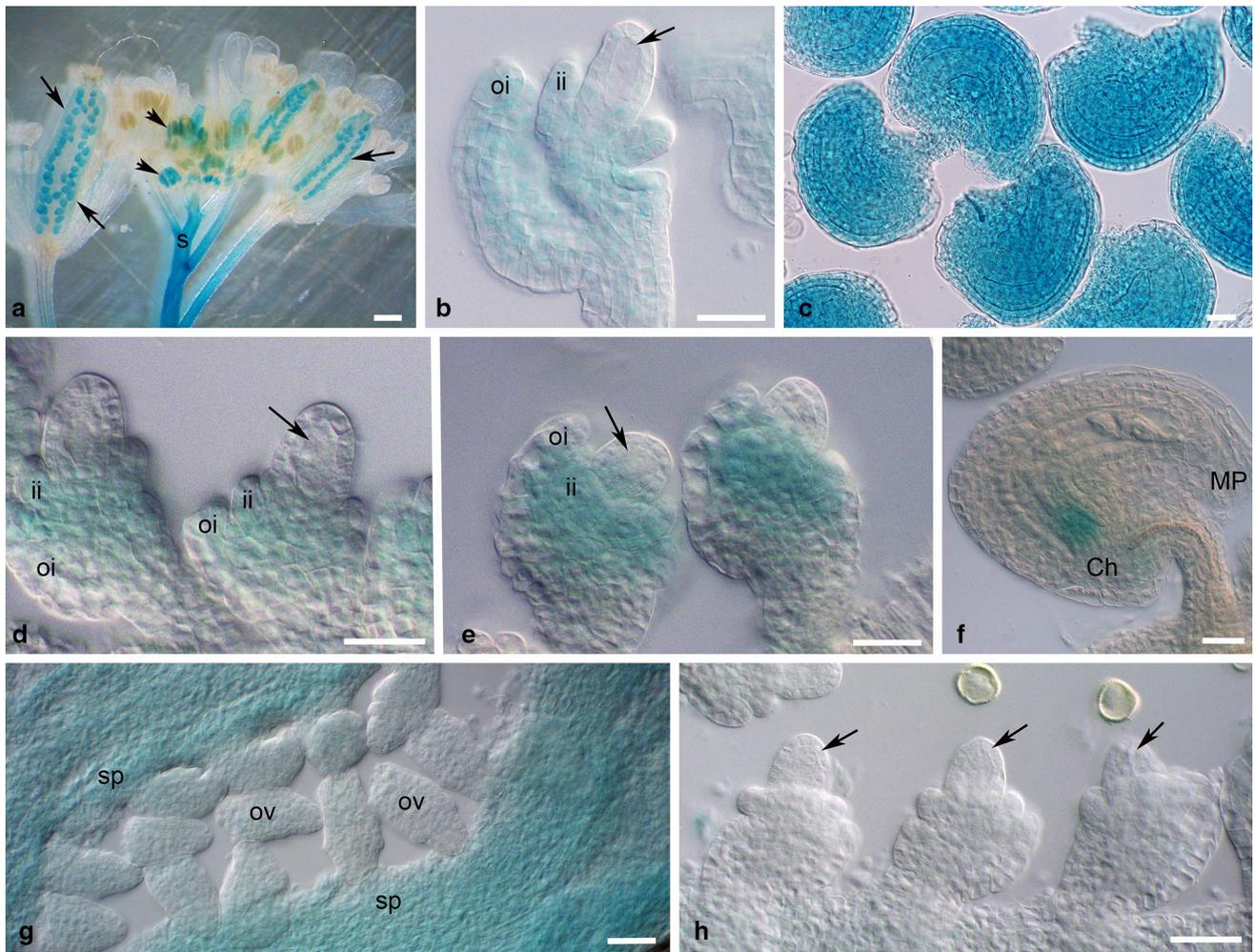


Fig. 5 Histochemical GUS analysis in inflorescences and ovules of *Arabidopsis thaliana* *pAtGID1::AtGID1-GUS* transgenic lines before anthesis. **a–c** *pAtGID1a::AtGID1a-GUS* line; **d–f** *pAtGID1b::AtGID1b-GUS* line and **g, h** *pAtGID1c::AtGID1c-GUS* line. **a** GUS staining can be observed in stem (S), ovules (arrows) and anthers (arrow heads). **b** At 2-III stage of the ovule development GUS signal was localized in the inner (ii) and the outer (oi) integuments, the expression was not detected in MMC in meiosis (arrow) and nucellar cells. **c** In the mature ovules the GUS signal was localized throughout the embryo sac and the integuments. **d** In the 2-III stage

and **e** first stage of gametogenesis, GUS signal was localized in the inner (ii) and outer (oi) integuments of the ovules, the expression was not detected in MMC in meiosis (arrow) and nucellar cells. **f** In the mature embryo sac the GUS signal was localized mainly in the chalaza (Ch) in comparison with the micropyle region (MP). **g** GUS signal was localized specifically in the septum (sp), but was completely absent in the ovules (ov) and funiculi. **h** GUS signal was undetectable in ovules, arrows showing the MMC in meiosis and the nucellar cells. MMC megaspore mother cell; Scale bars **a** 1 mm; **b–f** 20 μ m and **g, h** 50 μ m

p35S::AtGID1a plants the number of seeds per silique increased relatively to wild-type. The transgenic plants from both genotypes showed an average of 55 seeds per silique in the 30 siliques counted with 1.5% of aborted seeds, while wild-type plants, under the same environmental conditions, presented an average of 46 seeds per silique in the 32 siliques counted with 2.5% of abortion rate. Statistical analysis (*t* test) showed a significant difference between the number of seeds of the transgenic plants ectopically expressing *AtGID1a*, independent of the promoter, *pSTK* ($p = 0.0009$) or *p35S* ($p = 0.001$) in respect of the wild-type plants (Fig. 8, Supplementary Table S1).

To investigate if the additional MMC-like cells had MMC identity, a *pKNU:nlsYFP* line (Tucker et al. 2012) was transformed with *p35S::AtGID1a*. The second generation of transgenic lines overexpressing *AtGID1a* showing 28% of additional MMC-like cells was analyzed (Supplementary Table S1). Plants *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a* showed only one cell expressing the YFP signal, indicating that one out of the two MMC-like cells acquired the proper MMC identity (Fig. 9).

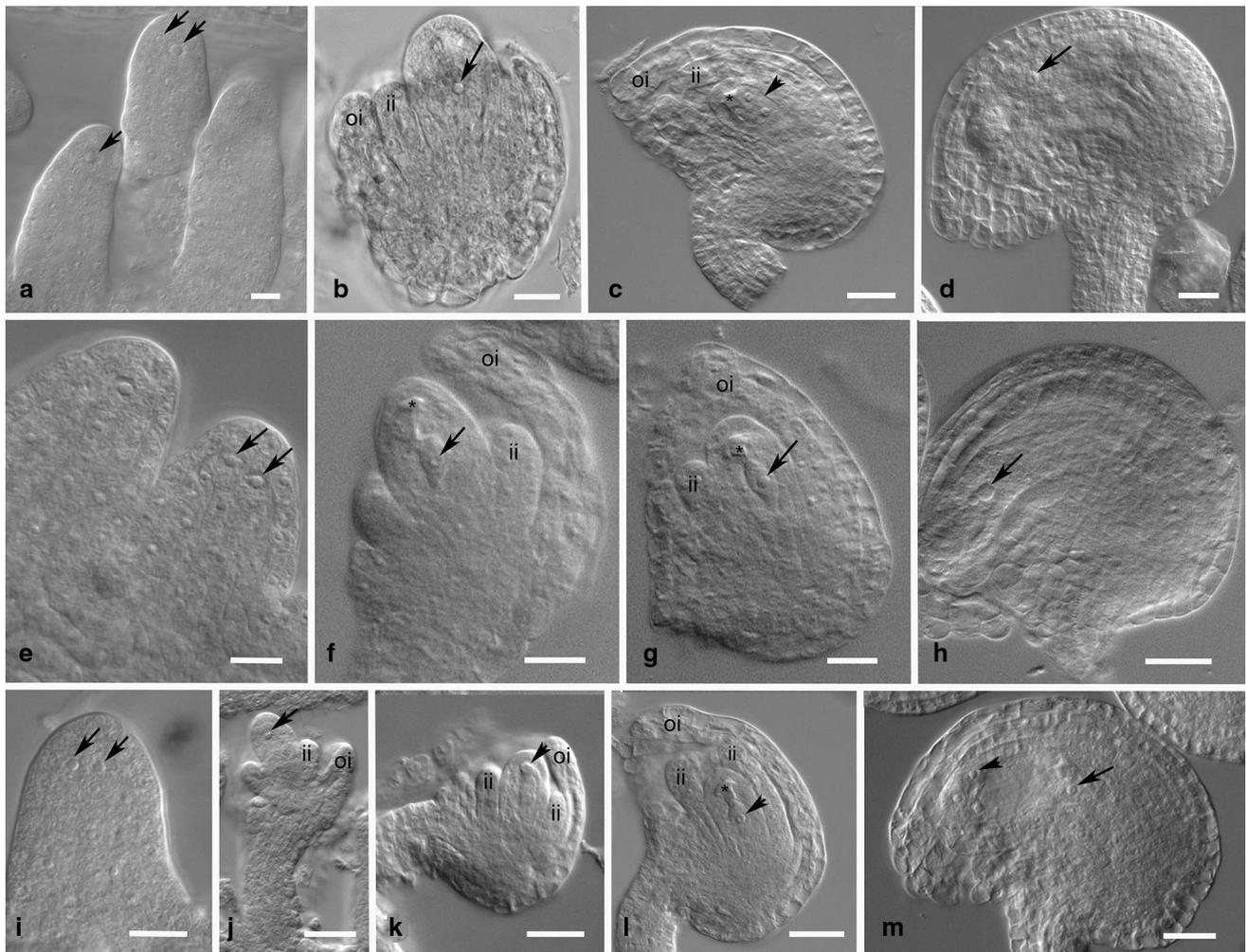


Fig. 6 Ovules of wild-type and *AtGID1a* overexpression lines of *Arabidopsis thaliana*. **a–d** Wild-type showing normal female gametophyte development. **a** Finger-like stage (2-I) showing MMC-like cells (arrows). **b** FG1 stage displaying MMC (arrow) integument development. **c** FG3 with degenerated megaspores and FG. **d** FG6 stage, arrow indicates the central cell. **e–h** *p35S::AtGID1a* line. **e** Finger-like stage (2-I), showing MMC-like cells (arrows). **f, g** FG1 stage showing well-developed integuments. **h** FG6 stage, arrow indicates the central cell. **i–n** *pSTK::AtGID1a* line. **i** Finger-like stage (2-I), viewing MMC-like cells (arrows). **j** showing MMC (arrow) and inner

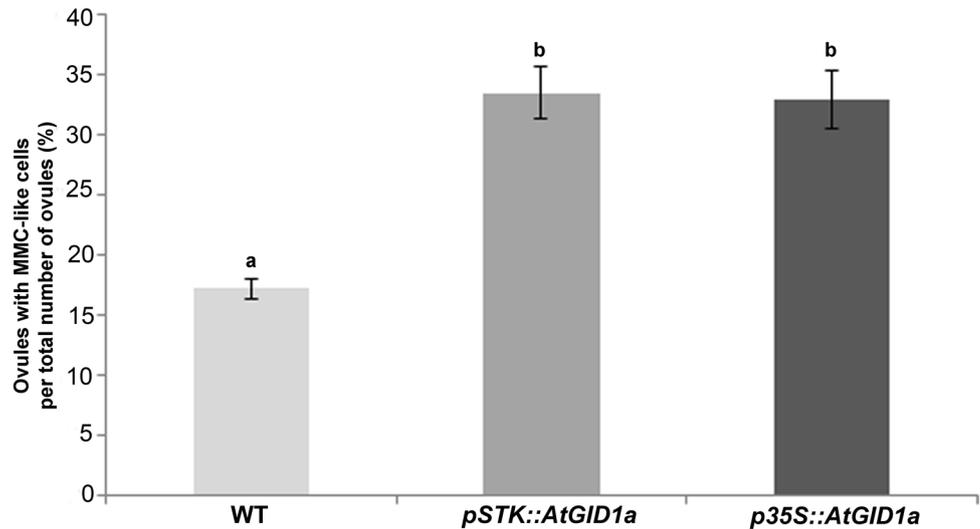
(ii) and outer (oi) integuments already growing. **k** Tetrad (arrowhead) and growing inner (ii) and outer (oi) integuments. **l** FG1 stage showing functional megaspore (arrowhead), degenerated megaspores and well-developed integuments. **m** FG6 stage with antipodal cells (arrow) and three nuclei at the micropylar pole (arrowhead). *ii* Inner integuments, *oi* outer integuments, *MMC* megaspore mother cell, *asterisk* degenerated megaspores, *FG* female gametophyte. Scale bars **a** 20 μ m; **b** 10 μ m; **c** 20 μ m; **d** 40 μ m; **e** 20 μ m; **f, g** 50 μ m; **h** 100 μ m; **i** 50 μ m; **j–l** 10 μ m and **m** 20 μ m

Discussion

GID1 acts in the activation of gibberellin via degradation of DELLA proteins (Davière and Achard 2013; Ueguchi-Tanaka et al. 2007). The detection of GID1 in the transcriptome database of ovaries of sexual and apomictic *B. brizantha* led us to investigate a putative role of this gene in the differential ovule development of sexual and apomictic plants. Alignment of the *BbrizGID1* sequence in databases showed high similarity with sequences from other species of the Poaceae family and the conserved motifs, HGG and GX SXG, from the HSL family. It was suggested that three conserved amino

acids of the HSL family form the catalytic triad center: serine (S), aspartic acid (D) and histidine (H) (Osterlund 2001). In all the *GID1* sequences of the Poaceae plants, in which similarity to *BbrizGID1* was detected, replacements of residues from this HSL catalytic center were verified. In rice, a replacement of the H by valine (V) did not affect the binding activity with gibberellin, although an absence of enzymatic activity was detected (Ueguchi-Tanaka et al. 2005). In *B. brizantha*, this same H of the catalytic triad is replaced by isoleucine (I) but S and D are conserved. The residues glycine (G) and arginine (R) are essential to maintain binding between the receptor and the bioactive gibberellin in rice

Fig. 7 Comparison among the number of ovules with additional MMC-like cells of wild-type and transgenic lines *pSTK::AtGID1a* and *p35S::AtGID1a* of *Arabidopsis thaliana*. Different letters indicate statistically significant differences between the number of additional MMC-like cells of transgenic plants and wild-type, independent of the promoter used for *AtGID1a* overexpression, *pSTK* ($p=0.009$) or *p35S* ($p=0.013$). *WT* wild-type, *N* number of ovules analyzed, *MMC* megaspore mother cell



(Nakajima et al. 2006; Ueguchi-Tanaka et al. 2005). Comparing the *GID1* sequence of *B. brizantha* with *Arabidopsis* revealed around 60% similarity of the *BbrizGID1* sequence with the three genes *AtGID1a*, *AtGID1b* and *AtGID1c*. In *Arabidopsis*, analysis of mutant combinations of the three genes showed an overlap of function among them (Griffiths et al. 2006). Complementation with each *AtGID1* gene rescued the dwarf phenotype of the rice gibberellin-insensitive mutant, showing conservation of function among them (Nakajima et al. 2006). *BbrizGID1* is present in the sexual and apomictic genotypes of *B. brizantha*. The restriction pattern of DNA from these plants, observed after *HindIII* digestion and genomic hybridization with *BbrizGID1* probe, suggested a possible different number of copies of the gene in sexual and apomictic plants.

Quantitative analysis of *BbrizGID1* expression showed the highest expression level in ovaries at early

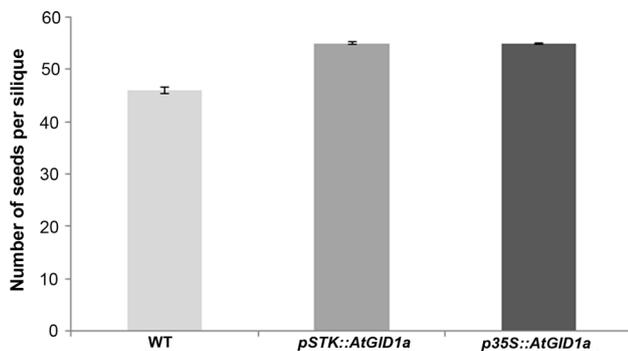


Fig. 8 Comparison among the number of seeds per silique in *pSTK::AtGID1a* and *p35S::AtGID1a* *Arabidopsis thaliana* relatively to wild-type (WT) plants. Different letters indicate statistically significant differences between the number of seeds of the wild-type and the transgenic plants ectopically expressing *AtGID1a*, independent of the promoter used, *pSTK* ($p=0.0009$) or *p35S* ($p=0.001$)

megasporogenesis, decreasing in the subsequent stages, independent of the reproductive mode of the plants. At this stage the formation of the MMC in sexual and apomictic genotypes was previously observed, but aposporous initial cells were still not detected in apomicts (Araujo et al. 2000). Analysis of these results suggested that *BbrizGID1* might participate in the early development of ovaries of sexual and apomictic *B. brizantha*, when growing integuments and the differentiation of MMC from nucellar cells occur. Localization of transcripts of *BbrizGID1* in ovules of *B. brizantha* from both reproductive modes revealed that MMC is expressing this gene, while in the surrounding nucellar cells the expression occurs only in the apomicts. These results suggested association of *BbrizGID1* expression not only with the development of MMC but also with the nucellar cells, previous to the differentiation of aposporous initials.

The overexpression of the *AtGID1a* gene in *Arabidopsis* significantly increased the number of additional MMC-like cells of the wild-type Columbia ecotype, suggesting that this gene might be associated with the differentiation of an additional MMC-like cell in the nucellus. Analysis of the second generation of *pKNU:nlsYFP p35S::AtGID1a* suggested that the trait was stably inherited. Different ratios of additional MMC-like cells were previously reported in *Arabidopsis* ecotypes (Rodríguez-Leal et al. 2015). Analysis of *ago9* mutants showed a percentage of abnormally MMC-like cells varying from 37.16 to 47.7%, with identity to gametic cells that do not undergo meiosis, a phenotype that resembles apomictic reproduction by apospory (Olmedo-Monfil et al. 2010). In our work, the identity of MMC was investigated by the expression of YFP marker genes under the control of the KNUCKLES promoter, which drives expression to the MMC (Tucker et al. 2012). *Arabidopsis pKNU:nlsYFP* line, overexpressing *AtGID1a*, showed only one cell with MMC identity in each ovule,

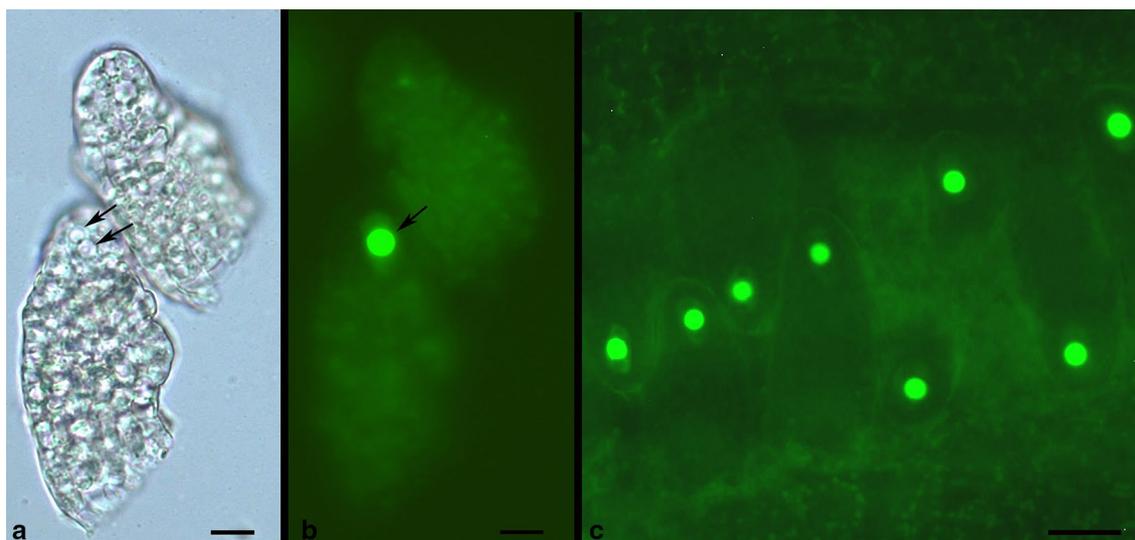


Fig. 9 *Arabidopsis thaliana* ovules of *pKNU:nlsYFP* line with the MMC YFP-labeled overexpressing *AtGID1a* under the control of *p35ScaMV*. **a** Ovules at the 2-III stage with two MMC-like cells (arrows) and **b** at the same moment using UV light showed signal of

fluorescence only in the MMC (arrow), not in the additional enlarged cells of the overexpressed plants. **c** Ovules finger-like (2-I) stage, showing yellow fluorescence in the MMC cells. MMC megaspore mother cell; scale bars **a–c** 10 μ m

comparable to what happens in plants of the *pKNU:nlsYFP* line, suggesting the possibility of identity other than with MMC to the MMC-like cells. It is important to note that the KNUCKLES promoter was not previously tested for identity of MMC-like cells.

Gallego-Giraldo et al. (2014) previously verified the differential expression of *AtGID1a*, *AtGID1b* and *AtGID1c* in ovules, at anthesis, using GUS staining. Expression of *AtGID1a* was detected in all tissues of the ovules, with higher expression observed in the surrounding of the ES, while *AtGID1b* expression was observed mainly in the chalaza zone, at the base of the ES, and *AtGID1c* was undetectable in the ovules. In our study, we detected *AtGID1a*, *AtGID1b* and *AtGID1c* expression reported by GUS assays during the early stages of ovule development, before anthesis. *AtGID1a* and *AtGID1b* were localized in the inner and outer integuments, not in MMCs and the surrounding nucellar cells. Expression signal of *AtGID1c* was not detected in the ovules, before anthesis. Our results suggested that *AtGID1a* and *AtGID1b* expression is associated with integument development in *Arabidopsis*. The association of the gibberellin and integument development was previously described (Gomez et al. 2016). In plants overexpressing *AtGID1a*, in comparison to the wild-type plants, an asynchrony between integument development and the stage of gametogenesis suggests that the ectopic expression of *AtGID1a* resulted in either a small delay in megasporogenesis or a faster growth of integuments in the transgenic plants. Consistent with the importance of gibberellin in the correct seed development to form seed-filled siliques, overexpressed

AtGID1a plants were fertile without any sign of ovule or seed abortion and their siliques were seed-filled.

We demonstrated *GID1* expression during megasporogenesis in ovules of sexual and apomictic *B. brizantha*, especially in the MMC. Specifically in ovules of the apomictic plants, *BbrizGID1* is also expressed in the nucellar cells, previously to aposporous initial cell differentiation. In *Arabidopsis*, overexpression of *AtGID1a* triggered the differentiation of MMC-like cells in the nucellar region. These data suggest the involvement of *GID1* in the early events of ovule and ES development.

Author contribution statement LGF, DMAD, ASTI, LC and VTCC designed the project; LGF, DMAD, ASTI, ACMMG, MAM and VTCC performed experimental procedures; LGF, DMAD, MAM, LC and VTCC, participated in the research, analyzed the data and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements The authors acknowledge Dr. Perez-Amaral who provided seeds of *pAtGID1a:AtGID1a-GUS*, *pAtGID1b:AtGID1b-GUS* and *pAtGID1c:AtGID1c-GUS* transgenic lines and Dr. Tucker who supplied seeds of *pKNU:nlsYFP* line. We also thank the assistance of Simona Masiero, Lilian Florentino and Júlio Rodrigues in the laboratory; Roberto Togawa and Priscila Grynberg in the bioinformatics analysis; and Joseane Padilha in the statistical analyses. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (449636/2014-3-VTCC) and the Brazilian Agricultural Research Corporation-Embrapa (02140101400.00-VTCC). This work is part of Luciana Gomes Ferreira's PhD thesis from Pós-Graduação em Biologia Molecular, University of Brasília-UnB,

Brazil, with fellowship from Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel—University of Brasília, CAPES-UnB, which also provided a 1-year fellowship at Università degli Studi di Milano, Italy. Foundation for Research Support of the Federal District-FAPDF provided financial assistance for LGF's participation in congresses.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25:3389–3402
- Alves ER, Carneiro VTC, Dusi DMA (2007) *In situ* localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. *Protoplasma* 231:161–171
- Araujo ACG, Mukhambetzhonov S, Pozzobon MT, Santana EF, Carneiro VTC (2000) Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Rev Bras Cytol Biol Vég Le Bot* 23:13–26
- Araujo ACG, Falcão R, Carneiro VTC (2007) Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). *Sex Plant Reprod* 20:109–121
- Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schmülling T (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:69–80
- Benfey PN, Ren L, Chua N (1990) Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO J* 9:1677–1684
- Brambilla V, Kater M, Colombo L (2008) Ovule integument identity determination in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 3:246–247
- Carneiro VTC, Dusi DMA, Ortiz JPA (2006) Apomixis: occurrence, applications and improvements. In: Silva JAT (ed) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and tropical issues*, vol 01. Global Science Books, Ikenobe, pp 564–570
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG et al (2003) Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497–3500
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743
- Cucinotta M, Colombo L, Roig-Villanova I (2014) Ovule development, a new model for lateral organ formation. *Front Plant Sci* 5:1–12
- Davière J-M, Achard P (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development* 140:1147–1151
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks BJ (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19–21
- Dusi DMA, Willemse MTM (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 41:151–162
- Gallego-Giraldo C, Hu J, Urbez C, Gomez MD, Sun TP, Perez-Amador MA (2014) Role of the gibberellin receptors GID1 during fruit-set in *Arabidopsis*. *Plant J* 79:1020–1032
- Gomez MD, Ventimilla D, Sacristan R, Perez-Amador MA (2016) Gibberellins regulate ovule integument development by interfering with the transcription factor ATS. *Plant Physiol* 172:2403–2415
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z-L, Powers SJ et al (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3399–3414
- Grossniklaus U, Schneitz K (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Cell Dev Biol* 9:227–238
- Gupta R, Chakrabarty SK (2013) Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav* 8:9
- Hartweck LM, Olszewski NE (2006) Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *Plant Cell* 18:278–282
- Kooiker M, Airoidi CA, Losa A, Manzotti PS, Finzi L, Kater MM (2005) BASIC PENTACYSTEINE1, a GA binding protein that induces conformational changes in the regulatory region of the homeotic *Arabidopsis* gene SEEDSTICK. *Plant Cell* 17:722–729
- Leblanc O, Armstead I, Pessino S, Ortiz JPA, Evans C, do Valle C et al (1997) Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. *Plant Sci* 126:49–58
- Liljegen SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404:766–770
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M et al (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* 46:880–889
- Olmedo-Monfil V, Duran-Figueroa N, Arteaga-Vazquez M, Demesa-Arevalo E, Autran D, Grimanelli D et al (2010) Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 464:629–633
- Osterlund T (2001) Structure–function relationships of hormone-sensitive lipase. *Eur J Biochem* 1907:1899–1907
- R Core Team (2016) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Rodrigues JCM, Cabral GB, Dusi DMA, Mello LV, Rigden DJ, Carneiro VTC (2003) Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Mol Biol* 53:745–757
- Rodríguez-Leal D, León-Martínez G, Abad-Vivero U, Vielle-Calzada J (2015) Natural variation in epigenetic pathways affects the specification of female gamete precursors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27:1034–1045
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–385
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schneitz K, Hulskamp M, Pruitt RE (1995) Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J* 7:731–749
- Silveira ED, Alves-Ferreira M, Guimaraes LA, da Silva FR, Carneiro VTC (2009) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. *BMC Plant Biol* 9:84
- Silveira ED, Guimaraes LA, Dusi DMA, da Silva FR, Martins NF, Costa MMC, Ferreira MA, Carneiro VTC (2012) Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. *Plant Cell Rep* 31:403–416
- Sun T (2010) Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* 154:567–570
- Suzuki H, Park S, Okubo K, Kitamura J, Ueguchi-Tanaka M, Iuchi S (2009) Differential expression and affinities of *Arabidopsis*

- gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant J* 60:48–55
- Tucker MR, Okada T, Hu Y, Scholefield A, Taylor JM, Koltunow AMG (2012) Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development* 140:1399–1404
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M et al (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437:693–698
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M (2007) Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:183–198
- Voegele A, Linkies A, Müller K, Leubner-Metzger G (2011) Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J Exp Bot* 62:5131–5147
- Yang W-C, Shi D-Q, Chen Y-H (2010) Female gametophyte development in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:89–108