



MARA JANE DA ROCHA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À APOMIXA AO
LONGO DO DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO EM
Urochloa decumbens e *Urochloa ruziziensis* (POACEAE)**

LAVRAS – MG

2020

MARA JANE DA ROCHA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À APOMIXA AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO EM
Urochloa decumbens e *Urochloa ruziziensis* (POACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Coorientador

LAVRAS – MG

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rocha, Mara Jane da.

Expressão de genes relacionados à apomixia ao longo do desenvolvimento reprodutivo em *Urochloa decumbens* e *Urochloa ruziziensis* (Poaceae) / Mara Jane da Rocha. - 2020.

54 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Coorientador(a): Welison Andrade Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. *Brachiaria*. 2. Reprodução apomítica. 3. Expressão gênica. I. Techio, Vânia Helena. II. Pereira, Welison Andrade. III. Título.

MARA JANE DA ROCHA

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À APOMIXA AO LONGO DO
DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO EM
Urochloa decumbens e *Urochloa ruziziensis* (POACEAE)**

**EXPRESSION OF APOMIXIS-RELATED GENES DURING REPRODUCTIVE
DEVELOPMENT IN
Urochloa decumbens e *Urochloa ruziziensis* (POACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de Junho de 2020.

Dr. Fausto de Souza Sobrinho

Prof. Dr. Thiago Alves Magalhães

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira

Prof. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos

EMBRAPA – CNPGL

UFLA

UFLA

UFLA

Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho nesta conquista.

Aos meus pais Fátima e Neto e meus irmãos Rodrigo, João, Juliete e Cida, Avó Maria e Madinha Otima, por todo o amor e por permanecerem sempre ao meu lado.

À minha orientadora Dra. Vânia Helena Techio pelo apoio, ensinamentos, paciência, dedicação e disponibilidade durante todo o doutorado. Sem você não chegaria até aqui.

Ao coorientador Dr. Welison Andrade Pereira pelos ensinamentos e disponibilidade durante a condução do trabalho.

A Dra. Heloisa Oliveira Dos Santos por disponibilizar o laboratório de sementes para realização das análises de RT qPCR.

À Ana Gabriela pela grande ajuda na realização dos trabalhos na anatomia e ao Rubéns e o Rafael do Laboratório de Sementes por me iniciarem nas técnicas de desenho de primers e RT qPCR. Sempre serei grata a vocês três.

Às amigas Paula e Thaíse pelo auxílio na análise estatística.

À todos os colegas e amigos do Grupo da Citogenética. Foram anos de convivência que me fizeram admirá-los como pessoas e pesquisadores de excelência que são. Já estou com saudades da convivência, risadas, diversão e o apoio durante a condução dos trabalhos.

Aos meus queridos amigos e amigas e as parceiras da república pelo apoio durante a caminhada.

Aos demais familiares pelo apoio.

Aos professores e funcionários tanto do Programa de Pós Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas, quanto de outros programas que tive oportunidade de cursar disciplinas, itens fundamentais para minha formação.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do doutorado.

À CAPES e FAPEMIG pelo fomento dos trabalhos e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Fausto Souza Sobrinho e à Embrapa Gado de Leite pela cedência do material, disponibilidade em colaborar e a parceria na pesquisa.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para essa conquista.

Muito Obrigada!

RESUMO

Urochloa decumbens é uma gramínea com predominância de reprodução apomítica que apresenta elevada importância como forrageira em países tropicais. Apesar disso, estudos com genes candidatos ao controle da apomixia nessa espécie ainda são limitados. *Urochloa ruziziensis*, por sua vez, apresenta modo de reprodução sexual e é relacionada geneticamente à *U. decumbens*. O objetivo do presente trabalho foi descrever os estágios de desenvolvimento do saco embrionário (megasporogênese e megagametogênese) associado aos caracteres morfométricos das espiguetas e caracterizar a expressão espaço temporal dos transcritos dos genes BbrizRan, BbrizStil e BbrizAGL6 em *U. ruziziensis* cv. Kennedy (diploide, sexual) e *U. decumbens* cv. Basilisk (tetraploide, apomítica). Inicialmente, foram obtidos os caracteres comprimento e diâmetro de espiguetas jovens e, na sequência, foram realizados os cortes anatômicos das mesmas. A análise da expressão foi realizada para os genes BbrizSti1, BbrizRan e BbrizAGL6, utilizando RT qPCR, em espiguetas nos estágios megasporogênese e megagametogênese. Os resultados mostraram que o comprimento da espiguetas pode ser usado como um marcador morfológico confiável para discriminar os dois estágios em *U. ruziziensis* e *U. decumbens*. A célula mãe do megásporo foi observada na megasporogênese em ambas as espécies. Os sacos embrionários observados foram do tipo *Polygonum* em *U. ruziziensis* e tipo *Panicum* em *U. decumbens*. A análise de RT qPCR indicou a atuação dos genes BbrizRan, BbrizStil e BbrizAGL6 no desenvolvimento reprodutivo de ambas. O gene BbrizStil apresenta maior expressão na planta apomítica durante a megasporogênese, indicando o envolvimento desse gene no estágio inicial da diferenciação em *U. decumbens*. O gene BbrizRan atua nos estágios inicial e final da diferenciação apomítica em *U. decumbens*. As informações obtidas neste estudo poderão ser ferramentas importantes para a realização de novos trabalhos para melhor compreensão da apomixia e da reprodução sexual em *Urochloa*.

Palavras-chave: *Brachiaria*. Reprodução apomítica. Expressão gênica.

ABSTRACT

Urochloa decumbens is a grass with predominance of apomictic reproduction that presents elevated importance as forage in tropical countries. However, studies with candidate genes to the apomixis control are still limited. *Urochloa ruziziensis* is genetically related to *U. decumbens*, but reproduces sexually. The aim of the present study was to describe the developmental stages of the embryonic sac (megaspороgenesis and megagametogenesis) associated with morphometric traits of the spikelets and to characterize the temporal space expression of BbrizRan, BbrizStil and BbrizAGL6 gene transcripts in *U. ruziziensis* cv. Kennedy (diploid, sexual) and *U. decumbens* cv. Basilisk (tetraploid, apomictic). Initially, the length and width of young spikelets were evaluated and anatomical cuts were performed. Expression analysis (using RT qPCR) was performed for the genes BbrizSti1, BbrizRan and BbrizAGL6, using spikelets during the megaspороgenesis and megagametogenesis stages. The results showed that the spikelet length can be used as a reliable morphological marker to discriminate both stages in *U. ruziziensis* and *U. decumbens*. The megaspore mother cell was observed in megaspороgenesis in both species. The embryonic sacs observed were classified as Polygonum type in *U. ruziziensis* and Panicum type in *U. decumbens*. The RT qPCR analysis indicated that the BbrizRan, BbrizStil and BbrizAGL6 genes are involved in the reproductive development of both species. The BbrizStil gene presents higher expression levels in the apomictic plant during megaspороgenesis, which indicates the involvement of this specific gene during the early stage of differentiation of *U. decumbens*. The BbrizRan gene acts in the early and final stages of apomictic differentiation of *U. decumbens*. The information obtained in this study may be useful for future studies that aim to better understand the apomixis and sexual reproduction in *Urochloa*.

Keywords: *Brachiaria*. Apomictic reproduction. Gene expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Caracterização botânica-agronômica das principais espécies de <i>Urochloa</i>	11
2.2	Aspectos gerais do melhoramento genético de <i>Urochloa</i>	14
2.3	Apomixia em <i>Urochloa</i>	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Material vegetal.....	24
3.2	Avaliação dos dados morfométricos das espiguetas e dos estágios de megasporogênese e megagametogênese.....	24
3.3.1	Excisão das espiguetas e delineamento experimental.....	25
3.3.3	Extração de RNA.....	25
3.3.4	Tratamento do RNA e síntese de cDNA.....	26
3.3.5	Seleção dos Genes de Referência, Genes Candidatos ao controle da apomixia, e desenho de primers.....	26
3.3.6	Avaliação da eficiência dos primers.....	27
3.3.7	Análise de RT qPCR.....	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Caracterização das espiguetas e das fases de megasporogênese e megagametogênese.....	28
4.2	Especificidade dos primers e eficiência da amplificação dos primers.....	33
4.3	Análise de RT qPCR.....	33
5	DISCUSSÃO.....	36
5.1	Descrição dos estágios megasporogênese e megagametogênese associados aos caracteres morfométricos das espiguetas.....	37
5.2	Verificação da especificidade dos primers pela curva de melting e eficiência da amplificação dos primers.....	39
5.3	Análise de RT qPCR.....	40
6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	APÊNDICE A - Perfil eletroforético de amostras de RNAs tratados com DNase obtidas a partir de espiguetas de <i>U. decumbens</i> cv. Basilisk e <i>U. ruziziensis</i> cv. Kennedy em gel de agarose 1%. As bandas observadas, de cima para baixo, são os RNAs 28S, 18S e 5,8S.....	54

1 INTRODUÇÃO

As pastagens constituem as principais fontes de nutrientes na alimentação de ruminantes sendo, desse modo, elemento fundamental para a cadeia produtiva pecuária. *Urochloa* P. Beauv. (syn. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) é o mais importante gênero de gramíneas forrageiras usado em pastagens em países tropicais (VALLE; PAGLIARINI, 2009). No Brasil, estima-se que, em 2014, esse gênero ocupava cerca de 85% das áreas de pastagens cultivadas (JANK et al. 2014).

Ainda assim, um número restrito de cultivares está disponível, reduzindo de modo significativo a heterogeneidade dos cultivos, conseqüentemente, tornando-os vulneráveis (VALLE; PAGLIARINI, 2009; ASSIS, 2009). Um exemplo é o crescimento da incidência de ataques de cigarrinhas em pastagens da cv. Marandu de *U. brizantha*, considerada resistente a esta praga (TOWNSEND et al., 2001). Desta forma, programas de melhoramento têm se aplicado ao objetivo de desenvolver novas cultivares de alto desempenho para uso na diversificação das pastagens (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Uma característica importante das espécies poliploides de *Urochloa* é a predominância da apomixia apospórica, a exemplo de *Urochloa brizantha* (Hochst. Ex. A. Rich.) R. D. Webster (syn. *Brachiaria brizantha* Hochst. Ex. A. Rich) ($2n=4x=36$), *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (syn. *Brachiaria decumbens* Stapf) ($2n=4x=36$) e *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (syn. *Brachiaria humidicola*) ($2n=4x=36$, $2n=6x=42$, $2n=6x=54$) (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009).

U. ruziziensis, *U. decumbens* e *U. brizantha* são filogeneticamente próximas e compõem um mesmo complexo agâmico (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996; CHIARI et al., 2008; VALLE; PAGLIARINI, 2009; PAULA; SOBRINHO; TECHIO, 2017). Dentre elas, *Urochloa ruziziensis* (R.Germ. & Evrard) Crins (syn. *Brachiaria ruziziensis* R. Germ. & Evrard) ($2n=2x=18$), é a única com predominância do modo de reprodução sexual (VALLE; MILES 2001), sendo aproveitada como parental feminino nos cruzamentos com *U. decumbens* e *U. brizantha* (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Para superar a barreira da ploidia e viabilizar os cruzamentos, diploides naturais de *U. ruziziensis* foram tetraploidizados artificialmente (VALLE; MILES, 2001; RISSO- PASCOTTO et al., 2005; ISHIGAKI et al. 2009; TIMBÓ et al. 2014).

A apomixia tem despertado o interesse de pesquisadores há anos. De acordo com Cruz; Federizzi; Milach (1998), a transferência dessa característica para espécies sexuais pode reduzir os custos e o tempo do melhoramento devido à produção mais rápida de genótipos superiores

estáveis. Além disso, pode facilitar a produção comercial de híbridos, dado que, o híbrido apomítico pode ser multiplicado ao longo das gerações, sem que ocorra perda no vigor ou variação no genótipo (HANNA; BASHAW; 1987; CRUZ; FEDERIZZI; MILACH, 1998; SAILE; SCHIMID; SAILER; SCHMID; GROSSNIKLAUS, 2016).

Análises de segregação mostram que a herança genética da apomixia em *Urochloa* é dominante e ligada a um único locus gênico (VALLE; SAVIDAN, 1996; VALLE; MILES 2001; ZORZATTO et al. 2010), o que, possivelmente, favorece a manipulação por engenharia genética (LACERDA, 2007). Nesse sentido, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de identificar genes expressos diferencialmente nos estágios de desenvolvimento do saco embrionário em genótipos contrastantes para o modo de reprodução em *Poa pratensis* L. (ALBERTINI et al., 2004), *U. brizantha* (RODRIGUES et al., 2003; LACERDA, 2007; SILVEIRA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013; LACERDA et al., 2013), *Pennisetum ciliare* (L.) Link (SINGH; BURSON; FINLAYSON, 2007) entre outras espécies com objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na manifestação dessa característica e identificar potenciais genes associados à apomixia.

Em *U. brizantha*, Rodrigues et al. (2003) identificaram sequências de cDNA expressas diferentemente em ovários de plantas sexuais e apomíticas utilizando os métodos DDPCR (*differential display* PCR) e northern blot. Alves; Carneiro e Dusi (2007), analisaram a expressão espaço-temporal de três sequências de cDNA, BbrizMYO, BbrizAQP e BbrizMAP, correspondendo a miosina, aquaporina e proteína quinase ativadora de mitose (MAPK), respectivamente, por hibridização *in situ*, sendo sugerida a atuação destes genes no desenvolvimento do embrião apomítico apospórico. Silveira et al. (2012) relataram o sequenciamento e análise da expressão de etiquetas de sequência expressa (ESTs) utilizando a análise de macroarranjos e RT qPCR, e sugeriram o envolvimento de quatro sequências, BbrizHelic, BbrizRan, BbrizSec13 e BbrizSti1, nos passos iniciais da diferenciação do saco embrionário apomítico, tipo *Panicum*. Em outro estudo, Guimarães et al. (2013) identificaram uma modulação diferencial do gene MADS-box BbrizAGL6 em genótipos apomíticos e sexuais em *U. brizantha*.

Os mecanismos que desencadeiam a manifestação da apomixia foram pouco estudados até o momento em *U. decumbens*. Dusi (2001) mostrou diferenças na expressão do gene SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) no desenvolvimento embrionário zigótico e autônomo dessa espécie. Esse gene atua na embriogênese somática em angiospermas e está associado a processos apomíticos (DUSI, 2001; PODIO et al. 2014a). Worthington et al. (2016) desenvolveram mapas de ligação saturados para os genomas materno e paterno e de uma

população de mapeamento F1 interespecífica entre *U. ruziziensis* e *U. decumbens* e identificaram algumas marcas moleculares co-segregando com a região genômica de aposporia (ASGR). A partir deste estudo, a ASGR foi mapeada para uma região de baixa taxa de recombinação no cromossomo 5 de *U. decumbens* (WORTHINGTON et al., 2016).

Devido à complexidade dos mecanismos que desencadeiam a apomixia apospórica, nenhum estudo desenvolvido até o momento foi conclusivo (SCHMIDT, 2020). Desse modo, estudos adicionais ainda são necessários para validar os trabalhos anteriores e gerar novas informações confiáveis sobre a manifestação da apomixia.

Ante o exposto, o estudo de genes candidatos ao controle da apomixia em *U. decumbens* em detrimento à expressão de tais genes em genótipos sexuais, a exemplo de *U. ruziziensis*, poderá contribuir sobremaneira com informações a respeito dos mecanismos que desencadeiam a apomixia nessa espécie e validar genes já descritos associados a esta característica.

Portanto, o objetivo do presente trabalho é descrever os estágios de desenvolvimento do saco embrionário (megasporogênese e megagametogênese) associado aos caracteres morfométricos das espiguetas e caracterizar a expressão espaço-temporal dos genes *BbrizRan*, *BbrizStil* e *BbrizAGL6* em *U. ruziziensis* cv. Kennedy (diploide, sexual) e *U. decumbens* cv. Basilisk (tetraploide, apomítica).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização botânica-agronômica das principais espécies de *Urochloa*

O gênero *Urochloa* P. Beauv. [Sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.] é pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae. Este gênero apresenta ampla ocorrência em regiões tropicais e subtropicais do mundo sendo composto por cerca de 135 espécies, em sua maioria, de origem africana (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996; STEVENS, 2017).

Espiguetas em gramíneas apresentam uma ou mais flores associadas a brácteas. De modo geral, em *Urochloa* são biflorais, com a flor do flósculo superior estaminada e pistilada (hermafrodita) e a inferior é estaminada ou vazia (estéril) (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

Os principais caracteres taxonômicos que diferenciam o gênero *Brachiaria* dos demais gêneros da tribo Paniceae são as espiguetas ovais a oblongas, arranjadas em racemos unilaterais, com a gluma inferior adjacente à ráquis (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). Apesar disso, os limites taxonômicos do gênero, tanto em nível de espécies componentes quanto em inter-relação com outros gêneros, não são consistentes (ASSIS et al., 2003; TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005; VALLE; PAGLIARINI, 2009), e com base em estudos morfológicos (ZULOAGA et al. 2003) e filogenéticos baseados no polimorfismo das sequências dos nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico nuclear (rDNA), pesquisadores reclassificaram grande parte das espécies de *Brachiaria* para o gênero *Urochloa* (TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005). Esta nova sistemática tem sido aplicada no Brasil como forma de sinônimos para algumas espécies do gênero, sendo nomeadas *Urochloa brizantha*, *Urochloa decumbens*, *Urochloa dictyoneura*, *Urochloa humidicola* e *Urochloa ruziziensis* (VALLE, 2010). Dessa forma, para o presente estudo também se optou por adotar esta nova classificação.

As espécies de maior importância econômica do gênero, *U. decumbens* Stalp., *U. brizantha*, Stapf., *U. humidicola* (Rendle) Schweickt e *U. ruziziensis*, Germain Evrard, são utilizadas como forrageiras (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996), sendo considerado o mais importante gênero de gramíneas forrageiras usadas em pastagens em países tropicais (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Segundo o censo agropecuário, em 2017, a maioria das terras utilizadas no país correspondia a áreas de pastagens, cerca de 45% (aproximadamente 159 milhões de hectares) (IBGE, 2017). Destes, 70% correspondem a pastagens plantadas (aproximadamente 111

milhões de hectares) (IBGE 2017). De acordo com Jank et al. (2014), em 2014, *Urochloa* ocupava cerca de 85% das áreas de pastagens cultivadas no Brasil.

O Brasil detém a posição de maior produtor, consumidor e exportador de sementes forrageiras tropicais do mundo (ABRASEM, 2016). *Urochloa* também é destaque nesse segmento, sendo *U. brizantha* (104.138,37 ton.) a espécie mais produzida, seguida por *Panicum maximum* Jacq. (33.596,59 ton.), *Urochloa decumbens* cv. Basilisk (19.631,98 ton.) e *Urochloa ruziziensis* (15.349,02 ton.) (ABRASEM, 2016).

De modo geral, estas gramíneas apresentam características agronômicas bastante vantajosas como tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade. Além disso, oferecem alto poder de rebrota com boa persistência sob condições de intensa desfolhação (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002).

U. decumbens foi à primeira espécie introduzida oficialmente no Brasil, tendo origem da Região dos Grandes Lagos em Uganda (África) apresentando boa adaptação, especialmente no Cerrado (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1988). A cultivar de maior importância econômica desta espécie é a *U. decumbens* cv. Basilisk. A espécie se caracteriza por apresentar modo de reprodução apomítico, sendo propagada principalmente por sementes. Destaca-se por emitir grandes quantidades de estolões, de fácil enraizamento que determinam uma elevada cobertura vegetal do solo, protegendo-o da erosão sendo, inclusive, mais recomendada para topografias acidentadas (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002). Apresenta hábito de crescimento semiereto, altura de 0,3 a 1m. Colmos geniculatos ramificados, radicantes nos nós. Rizomas pequenos e duros (VALLE et al., 2010). Suas folhas são pubescentes e as inflorescências racimosas contêm racemos com fila dupla de sementes também pubescentes, ráquulas em ziguezague e finas (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1988).

Outra característica importante é que as plantas de *U. decumbens* apresentam tolerância ao sombreamento, solos ácidos e pobres. Porém, devido à susceptibilidade à cigarrinha das pastagens tem sido substituída por outras espécies, principalmente *U. brizantha* cv. Marandu (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002).

Também originária da África (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1988), *U. brizantha* foi introduzida no Brasil por volta de 1967 (NUNES et al., 1984), a cv. Marandu se tornou a partir da década de 1980, a forrageira mais plantada no Brasil (MACHADO et al., 2010). É uma espécie apomítica (ALVES; CARNEIRO; ARAUJO, 2001). De modo geral caracteriza-se por apresentar hábito de crescimento ereto, reprodução principalmente por sementes e é considerada resistente à cigarrinha das pastagens. Apresenta elevada produtividade, fácil estabelecimento, boa cobertura do solo, boa qualidade forrageira (ALVIM; BOTREL;

XAVIER, 2002; VALLE et al., 2010). As cultivares de maior importância econômica desta espécie são *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* cv. La Libertad, *U. brizantha* cv. Xaraés e *U. brizantha* cv. Piatã (VALLE et al., 2010).

Caracteriza-se por ser rizomatosa, cespitosa, perene com folhas eretas e largas, levemente pilosas ou glabras, de coloração verde-escuro, com margens ásperas, inflorescência racimosa com 2,5 a 16 cm de comprimento e possuindo racemos de 2 a 8 cm, com espiguetas pediceladas e em fila única ao longo dos mesmos. Espiguetas sem cerdas e quase glabras (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1988) com flósculo basal masculino e flósculo apical hermafrodita (VALLE et al., 2010).

U. ruziziensis é nativa do Congo (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1988) e tem como principais características a elevada qualidade nutricional e palatabilidade (ALVES et al., 2008). Também apresenta rápido e grande crescimento no início da estação chuvosa e compatibilidade com leguminosas. Esta espécie apresenta características vantajosas que possibilitam o seu uso de modo eficiente no sistema de plantio direto como menor demanda por herbicida na dessecação para estabelecer a cultura seguinte, rapidez de estabelecimento e boa qualidade da massa seca e a produção de sementes uniforme o que facilita seu controle (VALLE et al., 2010). Porém, é susceptível à cigarrinha das pastagens e é considerada mais exigente em solos férteis (ALVES et al., 2008). A cultivar de maior importância econômica desta espécie é *U. ruziziensis* cv. Kennedy (VALLE et al., 2010).

U. ruziziensis é a única espécie do gênero, dentre as cultivadas, que apresenta modo de reprodução sexual. Esta característica tem sido aproveitada pelos programas de melhoramento para a geração de variabilidade e seleção de genótipos promissores (SOUZA SOBRINHO; LÉDO; KOPP, 2007). No trabalho de Souza Sobrinho; Lédo; Kopp (2007) foram obtidas progênes de *U. ruziziensis* que superaram o desempenho das testemunhas *U. decumbens* cv. Basilisk, *U. brizantha* cv. Marandu, *U. ruziziensis* cv. Comum para os caracteres produtividade de biomassa de forragem verde e porcentagem de matéria seca.

Morfológicamente, *U. ruziziensis* caracteriza-se por ser perene, rasteira, atingindo até 1 m de altura, estolonífera, com rizomas curtos. Apresenta colmos decumbentes e geniculados com 3 a 4 mm de diâmetro sendo dotada de entrenós curtos. Apresenta folhas macias com 6 a 15 mm de largura e 10 a 25 cm de comprimento, possuindo aspecto aveludado devido à grande quantidade de pelos presentes nela. A inflorescência é uma panícula ereta de 5 a 7 racemos. Apresenta racemos curtos e com fileiras duplas de sementes, ráquias aladas e bastante largas, tornando-se uma característica que a distingue das outras espécies de *Urochloa*. Espiguetas

biflorais, sendo a inferior masculina e a superior hermafrodita (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1988).

2.2 Aspectos gerais do melhoramento genético de *Urochloa*

Um aspecto diferencial do melhoramento de forrageiras é que o alvo não se restringe a conseguir maior produtividade, mas também alcançar maior eficiência na sua conversão em produção animal (VALLE; JANK; RESENDE, 2009). Desse modo, são avaliadas nas forrageiras características que possam ser correlacionadas de forma indireta à produção animal, como a qualidade da forragem e o vigor de rebrota (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

Os objetivos dos programas de melhoramento de *Urochloa*, de modo geral, são cultivares persistentes, com alta produtividade, adaptadas aos solos de baixa fertilidade e com resistência duradoura à cigarrinha-das-pastagens. Adicionalmente, a cultivar deve apresentar resistência a rizoctoniose (*Rizoctonia solani*), boa produção e qualidade de forragem, boa produção de sementes, além de ausência de antiquidade, como, por exemplo, a fotossensibilização, presente em *U. decumbens*, e a ocorrência de oxalatos, em *U. humidicola* (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

A seleção direta de genótipos disponíveis nos bancos de germoplasma provenientes de coletas realizadas na África (centro de origem) tem sido o principal método de melhoramento utilizado pelos programas de melhoramento no Brasil (VALLE; MILES, 2001; KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006; VALLE; PAGLIARINI, 2009). São consideradas características agronômicas e tecnológicas para a seleção dos genótipos (VALLE; MILES, 2001). Alguns exemplos de cultivares obtidas são as cultivares Marandu, Xaraés (ASSIS, 2009) e Piatã (VALLE et al., 2007), todas *U. brizantha*, e a BRS tupi, *U. humidicola* (BARBOSA, 2012). Outro exemplo recente desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS é a cultivar de *U. brizantha* BRS Paiaguás, introduzida de Nairóbi, Quênia, de uma coleção coletada pelo CIAT em 1984 (VALLE et al., 2013).

Desde a década de 80, cruzamentos vêm sendo realizados a fim de ampliar a variabilidade genética. De modo geral, os cruzamentos em *Urochloa* envolvem a hibridação entre plantas apomíticas tetraploides e acessos sexuais diploides, nas quais foi realizada a duplicação artificial de cromossomos para a viabilização dos cruzamentos (VALLE; JANK; RESENDE, 2009; VALLE; PAGLIARINI, 2009).

O programa de melhoramento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária por meio do centro de pesquisas em Gado de Corte, e do Centro Internacional de Agricultura

Tropical (CIAT), visando explorar a apomixia, reunir características agronômicas importantes e gerar variabilidade genética, tem realizado cruzamentos interespecíficos, usando como genitores femininos acessos sexuais de *U. ruziziensis* ($2n=2x=18$), que foram tetraploidizados artificialmente e, como genitores masculinos (doadores de pólen), acessos ou cultivares das espécies *U. brizantha* e *U. decumbens*, ambas apomíticas tetraploides ($2n=4x=36$) (MILES; VALLE, 1996; VALLE; PAGLIARINI, 2009; VALLE; JANK; RESENDE, 2009).

Foram lançados pelo CIAT os híbridos ‘Mulato’ e ‘Mulato II’, sendo o primeiro desenvolvido a partir de um cruzamento inicial entre *U. ruziziensis* e *U. brizantha* cv. Marandu, polinizado por uma mistura de híbridos de *U. brizantha* (ARGEL et al., 2005) e o segundo desenvolvido pela seleção recorrente de linhagens sexuais da progênie do cruzamento entre *U. ruziziensis* e *U. decumbens* cv. Brasilisk, seguida de polinização aberta dos híbridos apomíticos (ARGEL et al., 2007). Em 2017, a Embrapa Gado de Corte lançou o híbrido BRS Ipyporã, resultante de um cruzamento entre *U. ruziziensis* e *U. brizantha* (VALLE et al., 2017). Ele apresenta vantagens como a adaptabilidade a solos de média fertilidade, bom valor nutritivo e resistência à cigarrinha *Mahanarva* (VALLE et al., 2017). No caso da *U. humidicola*, a existência de um acesso sexual possibilitou a realização de cruzamentos intraespecíficos (BOLDRINI; PAGLIARINI; VALLE, 2006).

Algumas das etapas do programa de melhoramento de *Urochloa* realizado na Embrapa Gado de Corte são apresentadas por Valle; Jank; Resende (2009) e envolvem a conservação de germoplasma, passando por cruzamentos controlados; a avaliação de progênies; os ensaios de Valor de Cultivo e Uso e os ensaios de apoio, como os de resistência à cigarrinhas-das-pastagens e os ensaios sob pastejo. Para realização dos cruzamentos controlados, as plantas sexuais são cultivadas em vasos em casa de vegetação e o pólen apomítico é trazido de inflorescências cortadas no campo (VALLE; JANK; RESENDE, 2009).

Na prática, a produção de híbridos no melhoramento de *Urochloa* depende do desenvolvimento de métodos rápidos, seguros e precoces para a triagem do modo de reprodução, sexual ou apomítico (ZORZATTO et al., 2010). Dependendo do modo de reprodução, os híbridos seguem caminhos diferentes ao longo do programa, sendo que, os híbridos apomíticos de alto desempenho podem ser lançados como cultivares, enquanto, os híbridos sexuais, por sua vez, geralmente serão utilizados em novos cruzamentos (VALLE; JANK; RESENDE, 2009).

Dentre as metodologias usadas para a detecção da apomixia estão o teste de manutenção do genótipo materno na prole, em que, todos os genes da progênie são derivados do genitor feminino, além de técnicas microscópicas, pela análise do desenvolvimento do saco

embrionário (FEI et al., 2019). Finalmente, ao nível molecular, tem-se buscado o uso de marcadores moleculares específicos para a apomixia (WORTHINGTON et al., 2016; THAIKUA et al. 2016; FEI et al., 2019).

Para a espécie *U. ruziziensis*, em razão do modo de reprodução sexual que facilita a realização de cruzamentos intraespecíficos, o programa de melhoramento desenvolvido na Embrapa Gado de Leite, tem se concentrado em acumular características desejáveis por meio de ciclos de seleção recorrente (SOUZA SOBRINHO; LÉDO; KOPP, 2011).

Pesquisas visando novas tecnologias de manejo, especialmente, o desenvolvimento de cultivares de forrageiras mais produtivas e adaptadas aos sistemas de produção pecuários, são fundamentais para aumentar a produtividade e sustentabilidade da criação bovina.

2.3 Apomixia em *Urochloa*

Apomixia é definida como um modo de reprodução assexuado por sementes (CRUZ; FEDERIZZI; MILACH, 1998; CARNEIRO et al., 2003; VALLE; PAGLIARINI, 2009). Caracteriza-se pelo desenvolvimento do embrião a partir de uma célula não fertilizada, ou seja, a formação do embrião ocorre sem a fusão dos gametas masculino e feminino (CARNEIRO et al., 2003). Dessa forma, a descendência mantém a constituição genética da planta mãe (ASSIS et al., 2003; KOLTUNOW, 1993).

A apomixia associada à sexualidade em um programa de melhoramento genético permite combinar características desejáveis de genitores por meio de cruzamentos e fixá-las permanentemente pela seleção de híbridos apomíticos (CRUZ; FEDERIZZI; MILACH, 1998; RODRIGUES et al., 2003; VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Dependendo da origem do embrião, a apomixia pode ser classificada em apomixia esporofítica ou gametofítica. Na apomixia esporofítica, também conhecida como embrionia adventícia ou nucelar, os embriões são formados diretamente a partir de células não reduzidas do nucelo, ou tegumento interno (KOLTUNOW, 1993; SINGH, 2002). Este tipo de apomixia ocorre em gêneros importantes como o *Citrus*, *Euphorbia*, *Mangifera*, entre outras (SINGH, 2002). Pode ocorrer a formação de mais de um embrião em uma semente, sexual e apomítico (CRUZ; FEDERIZZI; MILACH, 1998; NAUMOVA, 1993), sendo denominado poliembrionia (NAUMOVA, 1993).

No mecanismo de apomixia gametofítica, o desenvolvimento do embrião ocorre em um saco embrionário não reduzido (apomeiose). Existem dois tipos de apomixia gametofítica: a diplosporia e a aposporia. Em ambas, ocorre a formação de um saco embrionário e oosfera

com o mesmo complemento cromossômico da planta mãe. Contudo, elas diferem na origem do saco embrionário (CRUZ; FEDERIZZI; MILACH, 1998).

Conforme Koltunow (1993) e Singh (2002) na diplosporia, o saco embrionário origina-se por divisões da célula mãe do megásporo, e inclui dois tipos de sacos embrionários: *Taraxacum* e *Antennaria*. No tipo *Taraxacum*, a célula-mãe do megásporo entra na prófase-I meiótica, mas os cromossomos permanecem como univalentes, resultando em núcleos com complemento cromossômico somático. A segunda divisão ocorre, sendo produzidas díades com número de cromossomo não reduzido. Neste tipo de apomixia, as células dão origem a um saco embrionário de oito núcleos após três mitoses, semelhante ao mecanismo sexual, porém com núcleos não reduzidos. No saco embrionário tipo *Antennaria*, a célula mãe do megásporo não sofre meiose, mas sofre diretamente três divisões mitóticas, produzindo um saco embrionário não-reduzido (diploide) de oito núcleos. O embrião neste tipo de apomixia é formado por partenogênese da oosfera e o endosperma é formado de modo autônomo, por divisões dos núcleos polares do saco embrionário (SINGH, 2002; KOLTUNOW, 1993).

Na aposporia, o saco embrionário se origina por divisão mitótica de uma célula somática do nucelo (HANNA; BASHAW, 1987), podendo ser formados um ou mais sacos embrionários (SINGH, 2003). A via sexual e apomítica pode coexistir em um mesmo óvulo (HANNA; BASHAW, 1987). Este tipo de apomixia pode gerar sacos embrionários dos tipos *Hieracium* e *Panicum*. No tipo *Hieracium*, a célula inicial passa por três divisões mitóticas, sendo formado um saco embrionário com oito núcleos (SINGH, 2002). No tipo *Panicum*, as células iniciais apospóricas sofrem duas mitoses formando um saco embrionário com quatro núcleos não reduzidos (SINGH, 2002), consistindo de duas sinérgidas, uma oosfera e um núcleo polar (VALLE; MILES, 2001). O embrião neste tipo de apomixia é formado por partenogênese da oosfera. Na maioria das espécies, com apomixia apospórica, a formação do endosperma depende da ocorrência de fertilização do núcleo polar, sendo considerada pseudogâmica (KOLTUNOW, 1993). A apomixia em *Urochloa* é apospórica do tipo *Panicum* (VALLE; SAVIDAN, 1996).

O desenvolvimento do saco embrionário no óvulo em espécies sexuais e apomíticas é dividido didaticamente em dois estágios, a megasporogênese e a megagametogênese. De modo simplificado, na fase inicial conhecida como megasporogênese, uma única célula nucelar aumenta seu tamanho, formando a célula arquesporial. O arcosporium se diferencia diretamente na célula mãe do megásporo (megasporócito) e sofre meiose para produzir quatro megásporos. Posteriormente, três megásporos se degeneram e um torna-se funcional. Na fase final, conhecida como megagametogênese, o megásporo funcional sofre três divisões mitóticas

consecutivas, dando origem a um saco embrionário maduro do tipo *Polygonum* (saco embrionário presente na maioria das angiospermas) (GROSSNIKLAUS, 2001). Nas espécies apomíticas apospóricas, a ex. de *U. decumbens*, a fase equivalente a megaesgasporogênese é semelhante às plantas sexuais, contudo, a meiose é interrompida sendo formado apenas um meiócito alongado, que posteriormente se degenera (DUSI, 2001). Na etapa final, células do nucelo diferenciam-se em células iniciais apospóricas, estas aumentam seu tamanho e após sofrerem duas mitoses, são formados um ou mais sacos embrionários, de quatro núcleos tipo *Panicum* (DUSI; WILLEMSE, 1999, DUSI, 2001).

Em *Urochloa*, a apomixia é frequentemente associada a espécies poliploides (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Vale (1990) utilizou a técnica de ovários clarificados para caracterizar genótipos de *Urochloa* quanto ao modo reprodutivo, sendo avaliados 251 acessos, de 14 espécies diferentes e pelos seus resultados cerca de 222 apresentaram sacos embrionários apomíticos. Nesse estudo também foram encontrados acessos sexuais de *U. decumbens*, *U. brizantha*, *U. humidicola* antes consideradas como apomíticas obrigatórias. Os autores do trabalho relataram que os acessos sexuais sempre apresentaram sacos meióticos, mas nunca apospóricos. Os acessos apomíticos apresentaram sacos do tipo apospóricos simples ou múltiplos e, em alguns acessos, porcentagens variadas de sacos meióticos, sendo caracterizados como apomíticos facultativos (VALLE, 1990).

Estudos genéticos mostram que a apomixia em *Urochloa* apresenta herança tetrassômica monogênica, com a apomixia dominante sobre a sexualidade (VALLE; SAVIDAN, 1996; ZORZATTO et al. 2010). Desse modo, a segregação do cruzamento entre plantas sexuais e apomíticas resulta numa proporção de híbridos sexuais e apomíticos próxima de 1:1, ao passo que a autopolinização ou cruzamentos de sexuais, diploides ou tetraploides, origina progênes sexuais indicando recessividade da sexualidade. O modelo tetraploide sugerido para o genitor apomítico é Aaaa, para o sexual diploide é aa e para o sexual tetraploidizado é aaaa (VALLE; SAVIDAN, 1996). Em outras gramíneas como *Panicum maximum*, a apomixia é também controlada por um gene, com apomixia dominante sobre a sexualidade (SAVIDAN, 1983).

A identificação de marcadores moleculares fortemente ligados à apomixia possibilita determinar de forma mais rápida e barata o modo de reprodução de progênes segregantes em programas de melhoramento de espécies apomíticas (CARNEIRO et al., 2003; THAIKUA et al., 2016). Adicionalmente, estudos com marcadores moleculares fornecem informações relevantes para o isolamento de genes relacionados com a apomixia. Péssino et al. (1998), trabalhando com uma população segregante obtida do cruzamento de *U. brizantha* e *U.*

ruziziensis, identificaram três marcas RFLP e duas marcas AFLP associadas com o locus apomítico. Foi construído um mapa da região genômica de apomixia em *Urochloa*, e esta mostra alta homologia com o milho e o arroz. Em outro trabalho usando RAPD, Zorzatto et al. (2010) encontraram um marcador relacionado com a apomixia, em uma população F1 de *U. humidicola*. Os autores geraram um mapa da região, em que este marcador estava localizado a 4,61 cM de distância do locus alvo, sendo considerado útil na implantação de seleção assistida por marcadores moleculares para o modo de reprodução em *U. humidicola*.

No trabalho de Thaikua et al. (2016), foi gerada uma população de mapeamento constituída por híbridos entre três plantas tetraploides sexuais de *U. ruziziensis* cv. 'Miyaoikoku' cruzados com uma planta do híbrido apomítico 'Mulato'. A partir deste, foi obtido um conjunto de 12 marcadores AFLP cossegregados com a aposporia em um único locus (Apo) no grupo de ligação 2. Além disso, duas marcas foram localizados a 2,4 cM da região apomítica. De acordo com os autores do trabalho, este resultado suporta a associação do locus apomítico a grandes regiões cromossômicas únicas com supressão da recombinação. Um mecanismo semelhante foi encontrado em *Pennisetum squamulatum* (L.) R.B., onde 12 marcadores moleculares RAPD, em uma população híbrida interespecífica de 397 indivíduos, cossegregaram com a aposporia, indicando a existência de uma região genômica contínua específica de aposporia (ASGR), em que nenhuma recombinação genética foi detectada (OZIAS-AKINS; ROCHE; HANNA, 1998). De acordo com os autores, a ausência ou supressão da recombinação pode estar associada ao contexto cromossômico do locus da apomixia, ou pode ser uma consequência da sua evolução, essencial para a preservação da função do gene.

O trabalho de Conner et al. (2008) revelou a presença de múltiplas cópias do gene PsASGR-BABY BOOM-like (PsASGR-BBML), um membro do BBM-like, subgrupo do fator de transcrição APETALA 2, na região ASGR em *Pennisetum squamulatum* a partir da análise de sequências de clones de cromossomos artificiais bacterianos (BAC). Conner et al. (2015) inseriu, utilizando transgenia, o gene PsASGR-BBML em linhagens de milho sexuais tetraplóides. A expressão desse gene nas linhagens transgênicas promoveu o desenvolvimento de embriões por partenogênese e progênie haploide. Com base nessas evidências, os autores sugeriram a família de genes PsASGR-BBML como um componente do controle da partenogênese.

O par de iniciadores (*primers*) p779/p780 foi desenvolvido a partir de sequências do gene PsASGR-BBML (AKIYAMA et al., 2011). Worthington et al. (2016) avaliaram a amplificação seletiva do par de iniciadores p779/P780 em *Urochloa*, utilizando PCR, em uma população composta por um acesso de *U. ruziziensis*, cruzado com 3 acessos de *U. decumbens*

($2n = 4x = 36$), e 169 híbridos interespecíficos obtidos, segregantes para o modo de reprodução. Adicionalmente, avaliaram um painel de diversidade de *Urochloa*, composta por acessos de *U. decumbens* CIAT 606, *U. humidicola* CIAT 16888M, *U. brizantha* CIAT 6294/6297 e *U. ruziziensis*, além dos acessos *Panicum maximum* CIAT 26924 e *P. maximum* PI 1570664. Pelos resultados observados, esse primer foi eficiente no diagnóstico do modo reprodutivo indicando ser um marcador útil para seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento. Além disso, à região de genes ASGR-BBML foram conservadas nas espécies de Paniceae, sugerindo a região ASGR-BBML como candidata à determinação da apomixia apospórica. No trabalho de Worthington et al. (2016) também foi desenvolvido um mapa de ligação utilizando a população descrita anteriormente para a região da aposporia (ASGR) usando GBS (Genotipagem por Sequenciamento).

Diante da possibilidade de criar novas cultivares por meio da engenharia genética, há um interesse crescente em identificar o gene, ou genes, responsáveis pela apomixia (RODRIGUES et al., 2003; ALBERTINI et al., 2004), tendo como objetivo fixar genótipos pela manutenção da composição genética da planta mãe através de infinitas gerações. Também possibilita simplificar a produção comercial da semente híbrida, uma vez que, não ocorre contaminação por autofecundação e reduz a mistura mecânica (SAVIDAN, 2000; CARNEIRO et al., 2003; VALLE; PAGLIARINI, 2009). Outro aspecto de interesse é o silenciamento da apomixia em espécies que apresentam predominantemente modo de reprodução apomítico, a exemplo de gramíneas forrageiras, permitindo recombinação e a produção de novas variedades (CARNEIRO et al., 2003).

A expressão da apomixia ocorre na parte feminina da flor, o ovário, especificamente no óvulo, onde os sacos embrionários se desenvolvem e se diferenciam entre plantas sexuais e apomíticas (CARNEIRO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2012). Desta forma, a análise de genes diferencialmente expressos durante as fases de desenvolvimento do óvulo, em genótipos segregantes para o modo de reprodução, traz informações úteis na identificação de transcritos relacionados com o controle genético da apomixia, níveis de expressão e a sua modulação (ALBERTINI et al., 2004). O trabalho de Rodrigues et al. (2003) em *U. brizantha*, utilizaram as técnicas ddPCR (*differential display* PCR) e Northern blot com objetivo de identificar transcritos diferencialmente expressos em ovários de plantas apomíticas e sexuais nos estágios de megasporogênese e megagametogênese. A partir dos resultados, onze clones foram expressos diferencialmente, sendo seis no acesso apomítico, dois no acesso sexual e três em apomítico e sexual, mas, em diferentes estágios de desenvolvimento do ovário. De acordo com os resultados das análises das sequências, 5 dos 11 são homólogos de proteínas conhecidas,

dentre elas uma miosina, uma proteína cinase ativadora de mitose do tipo MAPK e uma aquaporina. Estas sequências foram denominadas, BbrizMYO, BbrizAQP e BbrizMAPK, respectivamente. Alves, Carneiro e Dusi (2007) determinaram a expressão espaço-temporal dos transcritos destes genes utilizando a técnica de hibridização *in situ* em ovários de plantas apomíticas e sexuais. Pelos resultados, transcritos do gene BbrizMYO foram expressos em sacos embrionários apomíticos e sexuais, porém sua expressão se deu um pouco mais tarde nos sacos embrionários apomíticos. BbrizMAPK e BbrizAQP foram expressos exclusivamente em sacos embrionários apomíticos, BbrizAQP no saco embrionário e integumentos e BbrizMAPK no saco embrionário, principalmente nas sinérgides. No trabalho é discutido o papel putativo desses genes na determinação da apomixia em *U. brizantha*.

Silveira et al. (2012) mostraram o sequenciamento e análise de etiquetas de sequências expressas (ESTs) de *U. brizantha* sexual e apomítica e sugerem expressão preferencial de genes em ovários no final da megasporogênese em plantas apomíticas, momento em que ocorre a degeneração dos megásporos e as iniciais apospóricas se diferenciam. No trabalho, foram obtidos 1647 ESTs de qualidade e, dentre estes, 257 codificaram proteínas conhecidas, sendo feitas inferências sobre sua atuação no desenvolvimento sexual e apomítico. Além disso, realizou-se análise de macroarranjo, sendo comprovado o padrão de expressão diferencial de cerca de 11 ESTs em ovários sexuais e apomíticos, e destas, 9 ESTs foram preferencialmente detectadas em ovários das plantas apomíticas. Pelas análises de RT-qPCR foi confirmada a expressão preferencial das 9 sequências e foi sugerido o envolvimento de quatro delas (BbrizHelic, BbrizRan, BbrizSec13 e BbrizSti1) no início da diferenciação do saco embrionário apomítico.

Estudos com genes relacionados à formação do órgão floral têm contribuído para uma melhor compreensão dos pontos de semelhança e diferença dos modos de reprodução sexual e apomítico (GUIMARÃES, 2012). Guimarães (2012) realizaram uma análise do perfil de expressão de genes da família MADS-box (fatores de transcrição relacionados com o desenvolvimento floral) em *U. brizantha*, em diferentes órgãos e momentos do desenvolvimento reprodutivo, pela reação RT-qPCR e ISH (hibridização *in situ*), visando relacionar a atuação destes genes à sexualidade e a apomixia. Foram clonados 3 tipos de genes MADs Box, BbrizAG, BbrizSEP, BbrizAGL6. Dois genes do tipo AG foram encontrados, BbrizAG1 e BbrizAG2, o primeiro mais expresso em anteras da planta apomítica e o segundo em anteras da planta sexual. BbrizSEP2 e BbrizAGL6 foram preferencialmente expressos em ovários e anteras de plantas apomíticas e sexuais. Transcritos de BbrizAGL6 foram localizados preferencialmente no nucelo e na célula mãe do megásporo de ovários da planta apomítica e

somente na célula mãe do megásporo da planta sexual, indicando a atuação desse gene na formação do gametófito feminino. O gene *BbrizAGL6* foi associado à expressão inicial da apomixia em *U. brizantha* (GUIMARÃES et al., 2013).

Análise por marcadores AFLPs sobre bibliotecas de cDNA (AFLP-cDNA) foi realizada para identificação de genes diferencialmente expressos em uma população segregante para o modo de reprodução, em três fases de desenvolvimento floral (pré-meiose, a meiose e pós-meiose), em *Poa pratensis* (ALBERTINI et al., 2004). Pelos resultados, a maioria dos genes expressos nas inflorescências exibiram padrões semelhantes nas vias sexuais e apomíticas, indicando para uma via de desenvolvimento conservada (ALBERTINI et al., 2004). Desse modo, é possível que a desregulação da via sexual altere o destino da célula, levando a supressão das etapas para a progressão sexual, dando origem a apomixia (BICKNELL; KOLTUNOW, 2004).

De forma simplificada, o desenvolvimento da apomixia gametofítica envolve três etapas: a formação do saco embrionário não reduzido, o desenvolvimento do embrião partenogênético sem fertilização e, em alguns casos, o desenvolvimento independente do endosperma (BRUKHIN, 2017). Uma hipótese para a ocorrência da apomixia é que os genes que controlam a mesma podem ser alelos variantes de genes que atuam durante o desenvolvimento sexual normal (RAVI; MOHAN; MARIMUTHU; SIDDIQI, 2008). Dessa forma, a técnica de knockouts de genes, especialmente em *Arabidopsis*, tem sido usada para estudar os genes que controlam os processos que determinam a apomixia (BRUKHIN, 2017). Ravi; Marimuthu; Siddiqi (2008) estudaram o gene *SWI1*, de *Arabidopsis*, que atua na coesão das cromátides irmãs e organização de centrômeros durante a meiose. Verificaram que mutações em *SWI1* levaram ao desenvolvimento do gameta feminino não reduzido. Os resultados desse estudo mostraram que alterações em um gene da planta sexual pode trazer apomeiose funcional (desenvolvimento do gameta não reduzido), um componente importante da apomixia (RAVI; MOHAN; MARIMUTHU; SIDDIQI, 2008).

Alterações da atividade de proteínas Polycomb foram associadas à ocorrência da apomixia (OHAD et al., 1999; LUO et al. 1999; BRUKHIN, 2017). A proteína Polycomb FIE (FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM) impede o desenvolvimento do endosperma antes que ocorra a fertilização (OHAD et al., 1996; OHAD et al., 1999). Os mecanismos de atuação dessa proteína se dão no gametófito feminino, onde ela atua impedindo a transcrição de genes da replicação nuclear da célula central até a ocorrência da fecundação (OHAD et al., 1999). Mutações no gene FIE afetam especificamente a célula central,

permitindo a replicação do núcleo dessa célula e o desenvolvimento do endosperma antes da fertilização (OHAD et al., 1999).

Proteínas FIS (FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED) estão envolvidas no controle do desenvolvimento da semente independente da fertilização em plantas sexuais (CHAUDHURY et al. 1997; LUO et al. 1999; BRUKHIN, 2017). O estudo de Luo et al. (1999) demonstrou que os genes FIS correspondem a um complexo que atua suprimindo o desenvolvimento da semente, incluindo o embrião e o endosperma, na ausência de fertilização e, depois da ocorrência da fertilização, este complexo também atua na promoção do desenvolvimento embrionário. Pelos resultados desse estudo, uma mutação para um alelo não funcional em qualquer um dos FIS1, FIS2 ou FIS3 resultaria na desrepressão dos genes de desenvolvimento das sementes, levando à expressão dos mesmos, desencadeando uma cascata de eventos que levam ao desenvolvimento parcial das sementes.

Na literatura está descrita uma gama de genes que demonstram possível envolvimento na determinação da apomixia (BRUKHIN, 2017; FEI et al. 2019), p. ex. APOLLO (CORRAL et al., 1998), AGO104 (SINGH et al., 2011), SERK e APOSTART (ALBERTINI et al., 2005) entre outros. Contudo, os principais componentes genéticos da apomixia ainda não foram totalmente determinados (BRUKHIN, 2017; FEI et al. 2019), evidenciando a importância de novos estudos com objetivo de elucidar o mistério envolvido na manifestação dessa característica, e viabilizar sua manipulação (BRUKHIN, 2017).

Estudos recentes tem indicado para uma possível influência da regulação epigenética na manifestação da apomixia (KUMAR, 2017; SCHMIDT et al., 2014). Dentre as evidências apontadas tem-se a observação da reversão sexual induzida epigeneticamente pela metilação do DNA, em *Paspalum simplex* (PODIO et al. 2014b). Contudo, os papéis dos mecanismos epigenéticos na determinação da apomixia ainda não foram elucidados (KUMAR, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As avaliações foram feitas em três clones de *U. decumbens* cv. Basilisk (apomítica e tetraploide, $2n=4x=36$) e três clones de *U. ruzizensis* cv. Kennedy (sexual e diploide, $2n=2x=18$) cedidos pela EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora – Minas Gerais (MG). As plantas foram mantidas em vasos na casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Anatomia Vegetal e de Citogenética e Genética Molecular, ambos no Departamento de Biologia, e, no Laboratório de Análises Moleculares de Sementes, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG cBrasil.

3.2 Avaliação dos dados morfométricos das espiguetas e dos estágios de megasporogênese e megagametogênese

Inflorescências jovens das duas espécies foram coletadas, fixadas em Carnoy (álcool etílico: ácido acético, 3:1) e conservadas à temperatura $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As espiguetas foram excisadas dos racemos e as imagens foram obtidas por um sistema de captura de imagem (Infinity 1) acoplado em um microscópio estereoscópio (Nikon SMZ7457). O comprimento e a largura de 28 espiguetas de *U. ruzizensis* e *U. decumbens* foram obtidos com auxílio do programa ImageJ 1.51j8 (SCHINDELIN et al., 2015), seguindo os parâmetros: medições a partir do pedicelo até a ponta da gluma superior para o comprimento (em mm) e largura máxima da espiguetas para o diâmetro (em mm).

Para a etapa de emblocamento, as espiguetas foram desidratadas em uma série crescente de concentrações de álcool etílico (70% – 80% – 90% – 100%), em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O material foi emblocado em historesina, utilizando-se o Kit Historesina de hidroxietilmetacrilato (Leica, Heidelberg, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Para isto, as amostras foram acondicionadas durante 24h em álcool etílico 100% + resina líquida (1:1). Depois, as amostras foram acondicionadas em resina ativada (resina + pó ativador), por um período mínimo de 72 horas. Na etapa seguinte, as espiguetas foram colocadas em histomoldes e infiltrados utilizando solução de inclusão (endurecedor e resina de infiltração) e polimerizados em estufa a $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas.

O seccionamento da espiguetta foi realizado em micrótomo rotativo semiautomático Yidi YD-335 (Jinhua Yidi Medical Appliance CO., LTD, Zhejiang, China) definindo-se a espessura do corte entre 6 a 7 μm . Os cortes foram distendidos sobre a lâmina e corados com Azul de Toluidina 1% (O'BRIEN; FEDER; McULLY, 1964). Lâminas permanentes foram montadas utilizando-se Verniz Geral e avaliadas em microscópio de campo claro (Zeiss, modelo Axio Lab), equipado com sistema de captura de imagem (AxioCam ERc5s) para digitalização das imagens. A partir disso foi possível determinar os estágios de desenvolvimento do saco embrionário de cada espiguetta em megasporogênese e megagametogênese.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa R (R CORE TEAM, 2020), com emprego do pacote agricolae.

3.3 Análise da expressão gênica

3.3.1 Excisão das espiguetas e delineamento experimental

As espiguetas foram excisadas dos racemos e classificadas com base nos parâmetros morfométricos descritos no item anterior. Imediatamente após a triagem, as espiguetas foram acondicionadas em microtubos, imersas em nitrogênio líquido e mantidas em ultra freezer à -80 °C. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo utilizadas três repetições biológicas, que consistiram de um pool de espiguetas nos estágios de megasporogênese e megagametogênese, coletadas de uma planta clonal de cada espécie.

3.3.3 Extração de RNA

Após a extração e quantificação do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase usando o kit Turbo DNA-free™ (Ambion) para a remoção de DNA genômico residual. Em seguida, o RNA foi novamente quantificado no equipamento Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000 e sua integridade verificada em gel de agarose a 1% com o tampão TAE (Tris, EDTA e ácido bórico). Procedeu-se com a síntese do cDNA, a partir do RNA tratado, utilizando o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) usando 1000 ng de RNA. Na sequência, as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até a análise.

3.3.4 Tratamento do RNA e síntese de cDNA

Após a extração e quantificação do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase usando o kit Turbo DNA-free™ (Ambion) para a remoção total de DNA genômico. Em seguida, o RNA foi novamente quantificado no equipamento Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000 e a integridade foi verificada em gel de agarose a 1% com o tampão TAE (Tris, EDTA e ácido bórico) (APÊNDICE A). Procedeu-se com a síntese do cDNA, a partir do RNA tratado, utilizando o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) usando 1000 ng de RNA. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

3.3.5 Seleção dos Genes de Referência, Genes Candidatos ao controle da apomixia, e desenho de primers

A análise de expressão foi realizada para os ESTs (Expressed Sequence Tags) BbrizSti1 (GenBank JG437135) e BbrizRan (GenBank JG437228), de bibliotecas de ovários antes da antese de *U. brizantha* previamente publicada e relacionada à apomixia em *U. brizantha* (SILVEIRA et al., 2012). O gene de *U. brizantha*, da família de genes MADS-box, BbrizAGL6 (JG417309) (GUIMARÃES et al. 2013) também foi considerado.

Para os ESTs BbrizSti1 e BbrizRan, os primers utilizados foram 5'GAGCCCATAGTGGTTCATCC3' / 5'TCGAAAGGAGCTGGTTCAGT3' e 5'CCGCCTATTTGTTTCCTTGTG3' / 5'AAAAGACTAGCCCCGCAAT3', respectivamente, de acordo com Silveira et al (2012). Para o gene BbrizAGL6, foi utilizado o par de primers 5'CTCACTCTGCTGCTATGGACT3' / 5'GCTGCGTGAATATGTTGGCTG3', desenhado a partir da sequência disponível no GenBank, utilizando o programa Primer3plus online (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) com Tm entre 59 °C e 61 °C e comprimento dos primers de 21 pb. O par de primers foi aferido quanto ao seu potencial de formação de grampos e dímeros utilizando o software OligoAnalyzer Tool online (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Os genes de referência testados foram validados no trabalho de Silveira et al. (2009) em *U. brizantha*, sendo mais estáveis em tecidos reprodutivos, Elongation factor-1 alpha (BbrizEF1), (GenBank EZ000623); e Ubiquitin-conjugating enzyme (BbrizUBCE), (GenBank GE617481). Também foi testado o gene Actina 12 (act12) (GenBank JG436709.1), de acordo com Takamori et al. (2017), selecionado em banco de dados de sequências de *U. brizantha*.

Os primers utilizados para o gene BbrizEF1, BbrizUBCE e act12 foram 5'ACCCTCCTCTTGGTCGTTTT3' / 5'AGCCCCTCATTCTTCTTGG3'; 5'GGTCTTGCTCTCCATCTGCT3' / 5'CGGGCTGTCGTCTCATACTT33' e 5'GGGTGGAGAGAGATTGCAGGTTA3' e 5'GGGAACTGAGGCAACCACAGA3', respectivamente, de acordo com Silveira et al. (2009) e Takamori et al. (2017).

3.3.6 Avaliação da eficiência dos primers

Inicialmente, verificou-se a especificidade de cada par de primer para as condições do presente estudo através da curva de dissociação (Melting curve). A eficiência de amplificação da PCR foi determinada para validação dos primers, utilizando um conjunto de todas as amostras de cDNA em uma diluição serial de cinco vezes. As diluições foram utilizadas em PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). As reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços. Para cada reação, utilizou-se 1 µL de cDNA, 5 µL de mistura master SYBR Green PCR (Applied Biosystems) na concentração 2.0X, 0,2 µL de primers forward e reverse, ambos com concentração de 20 pmol/ul, e 3,6 µL de água ultrapura autoclavada para compor o volume final de 10,0 µL / amostra. As condições da qPCR foram de 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 95 °C por 2 minutos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Foram adicionados nas análises controles negativos, compostos por água e controles endógenos. As reações foram realizadas em triplicatas. Os dados foram gerados automaticamente a partir do software v.2.0.1 do sistema qPCR 7500 em tempo real (Applied Biosystems). Este procedimento também possibilitou determinar a diluição do cDNA usada posteriormente nas reações de qPCR, que foi 1: 5.

3.3.7 Análise de RT qPCR

A quantificação da expressão dos genes alvo BbrizAGL6, BbrizSti1 e BbrizRan foi realizada em reações de RT qPCR como descrito anteriormente, compostas por quadruplicatas técnicas e triplicatas biológicas. Para a quantificação relativa empregou-se o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL et al., 2001). Como controles endógenos para normalização dos dados foram utilizados os genes BbrizEF1, BbrizUBCE e Actina 12 (act12) e foram calculados em relação a uma amostra de calibração, determinada com base no menor nível de expressão para cada gene.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das espiguetas e das fases megasporogênese e megagametogênese

Em *U. ruziziensis*, o comprimento e diâmetro das espiguetas variaram entre 2,475 a 5,891 mm e 0,507 a 1,930 mm, respectivamente (Tabela 1). Em *U. decumbens* (tetraploide e apomítica), por sua vez, o comprimento das espiguetas variou entre 2,766 a 5,811mm e diâmetro entre 0,896 a 2,129 mm (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização das espiguetas de *U. decumbens* cv. Basilisk (apomítica e tetraploide, $2n=4x=36$) e *U. ruziziensis* cv. Kennedy (sexual e diploide, $2n=2x=18$) quanto aos caracteres morfométricos: comprimento e diâmetro e o estágio de desenvolvimento do saco embrionário: megasporogênese (ME) e megagametogênese (MG).

Espécie	<i>U. ruziziensis</i>			<i>U. decumbens</i>			
	Espiguetas	Comprimento	Diâmetro	Estágio	Comprimento	Diâmetro	Estágio
1		2,475	0,507	ME	2,766	0,995	ME
2		3,454	0,975	ME	3,095	1,134	ME
3		3,971	1,025	ME	3,144	0,955	ME
4		3,980	0,786	ME	3,164	1,224	ME
5		4,34	1,057	ME	3,184	1,025	ME
6		4,597	1,154	ME	3,413	1,154	ME
7		4,700	1,095	ME	3,512	1,144	ME
8		4,716	1,184	ME	3,592	1,294	ME
9		5,025	1,303	MG	3,622	0,896	ME
10		5,085	1,224	MG	3,632	1,194	ME
11		5,085	1,682	MG	3,944	1,761	ME
12		5,134	1,473	MG	4,033	1,473	ME
13		5,174	1,373	MG	4,119	1,801	ME
14		5,174	1,612	MG	4,291	1,154	ME
15		5,224	1,761	MG	4,657	1,612	ME
16		5,313	1,781	MG	4,689	1,174	ME
17		5,353	1,731	MG	4,816	1,811	ME
18		5,373	1,821	MG	5,069	1,771	MG
19		5,403	1,801	MG	5,095	1,532	MG
20		5,443	1,542	MG	5,146	2,020	MG
21		5,522	1,781	MG	5,171	1,930	MG
22		5,542	1,851	MG	5,198	1,940	MG
23		5,552	1,274	MG	5,328	1,612	MG
24		5,612	1,811	MG	5,396	1,950	MG
25		5,662	1,751	MG	5,430	2,100	MG
26		5,672	1,930	MG	5,473	2,129	MG
27		5,781	1,930	MG	5,504	2,030	MG
28		5,891	1,672	MG	5,811	2,100	MG

Fonte: Do autor (2020).

Os resultados da análise de variância mostraram diferenças significativas pelo teste F, a 5% de probabilidade, entre as espécies *U. ruzizensis* e *U. decumbens*, para o caráter comprimento da espiguetas (Tabela 2). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas, entre as espécies, em relação à característica diâmetro da espiguetas (Tabela 2). A comparação entre os estágios megasporogênese e megagametogênese mostrou que há diferenças significativas para o comprimento e o diâmetro das espiguetas (Tabela 2).

Tabela 2- Resumo da análise de variância dos caracteres comprimento (cm) e diâmetro (cm) avaliados em espiguetas de *U. decumbens* cv. Basilisk (apomítica e tetraploide, $2n=4x=36$) e *U. ruzizensis* cv. Kennedy (sexual e diploide, $2n=2x=18$) nos estágios de desenvolvimento, megasporogênese (ME) e megagametogênese (MG).

Fontes de variação	Quadrado médio		
	GL	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
Espécies (E)	1	5,759***	0,073
Estágio de desenvolvimento (ED)	1	27,367***	5,364***
Resíduos	52	0,227	0,059

Fonte: Do autor (2020).

As médias do comprimento e do diâmetro das espiguetas de *U. ruzizensis* e *U. decumbens* foram separadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Tabela 3). *U. ruzizensis* (5,00a) apresentou maior média de comprimento das espiguetas em relação a espécie *U. decumbens* (4,37b) (Tabela 3). Para o diâmetro das espiguetas, *U. ruzizensis* (1,53a) e *U. decumbens* (1,46a) apresentaram médias iguais (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios dos caracteres comprimento (cm) e diâmetro (cm) avaliados em espiguetas de *U. decumbens* cv. Basilisk (apomítica e tetraploide, $2n=4x=36$) e *U. ruzizensis* cv. Kennedy (sexual e diploide, $2n=2x=18$).

Genótipos	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
<i>U. ruzizensis</i>	5,00a	1,53a
<i>U. decumbens</i>	4,37b	1,46a

*médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de tukey ($P < 0,05$)

Fonte: Do autor (2020).

Em relação as fases de desenvolvimento, verificou-se que a megasporogênese apresentou médias de comprimento e diâmetro, significativamente inferiores, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Tabela 4). As médias do comprimento foram 3,83 e 5,37 mm e do diâmetro foram 1,14 e 1,78 mm, para a megasporogênese e megagametogênese, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios dos caracteres comprimento (mm) e diâmetro (mm) avaliados em espiguetas nos estágios de desenvolvimento: megasporogênese (ME) e megagametogênese (MG).

Estágio de desenvolvimento	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
Megasporogênese (ME)	3,83b	1,14b
Megagametogênese (MG)	5,37a	1,78a

*médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de tukey (P< 0,05)

Fonte: Do autor (2020).

As médias do comprimento (mm) e diâmetro (mm) das espiguetas, nos estágios de megasporogênese e megagametogênese para *U. ruzizensis* e *U. decumbens* foram separadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Tabela 5). O comprimento das espiguetas no início do desenvolvimento, megasporogênese, foi coincidente, para *U. ruzizensis* (3,98b) e *U. decumbens* (3,74b), não diferindo estatisticamente (Tabela 5). Por sua vez, para o diâmetro das espiguetas, *U. decumbens* (1,35c) apresentou maior comprimento das espiguetas em relação à *U. ruzizensis* (1,09d) (Tabela 5).

Em *U. ruzizensis*, a megasporogênese foi observada em espiguetas com comprimento variando entre 2,475 e 4,716 mm e diâmetro entre 0,507 e 1,184 mm (Tabela 1). Para *U. decumbens*, esse estágio foi observado em espiguetas com comprimentos entre 2,766 e 4,816 mm e diâmetros entre 0,896 a 1,811 mm (Tabela 1).

Tabela 5 - Valores médios dos caracteres comprimento (mm) e diâmetro (mm) avaliados em espiguetas de *U. decumbens* cv. Basilisk (apomítica e tetraploide, 2n=4x=36) e *U. ruzizensis* cv. Kennedy (sexual e diploide, 2n=2x=18) nos estágios de desenvolvimento, megasporogênese e megagametogênese.

Espécie/Estágio de desenvolvimento	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)
<i>U. ruzizensis</i> /Megagametogênese	5,39a	1,65b
<i>U. decumbens</i> /Megagametogênese	5,32a	1,95a
<i>U. ruzizensis</i> /Megasporogênese	3,98b	1,09d
<i>U. decumbens</i> /Megasporogênese	3,74b	1,35c

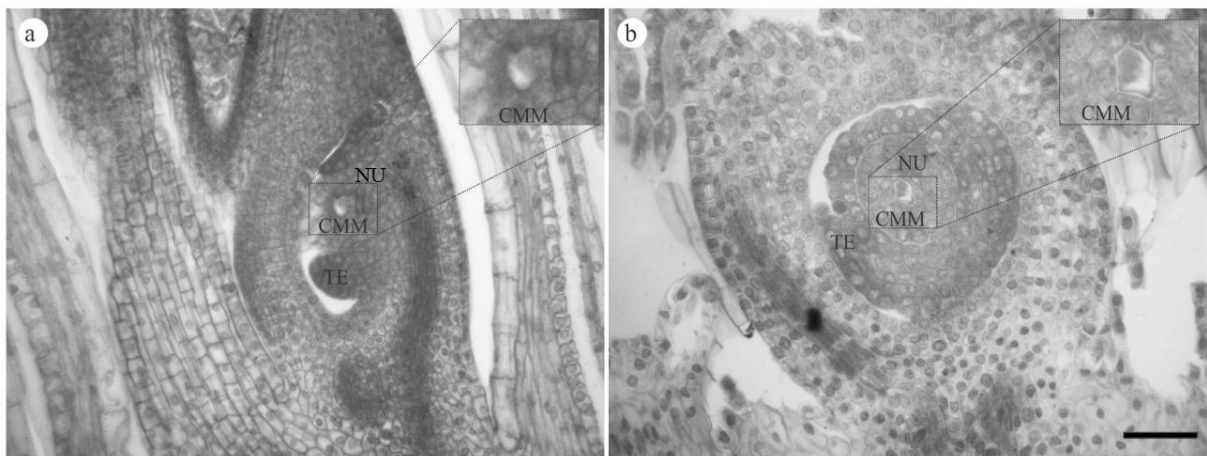
*médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de tukey (P< 0,05)

Fonte: Do autor (2020).

Para ambas as espécies, a megasporogênese se caracterizou tipicamente pela presença de células nucleares em torno da célula mãe do megásporo (CMM). A CMM apresenta origem em células nucleares internas e está situada no pólo micropilar. Esta diferencia-se das demais

células presentes nas camadas do nucelo pelo seu maior tamanho, grande vacúolo e núcleo aparente. Na medida em que o comprimento da espiguetas aumentou, foi observado um alongamento da CMM, visivelmente maior e com o núcleo mais denso. Essa fase também foi caracterizada pelo início do estabelecimento tegumento primordial. Este se encontra ao redor do nucelo, na parte inferior do ovário, na região da calaza (Figura 1a, b).

Figura 1 - Megasporogênese em: a) *U. ruzizensis* cv. Kennedy (sexual) e b) *U. decumbens* cv. Basilisk (apomítica). Secções longitudinais das espiguetas evidenciando a célula célula-mãe do megásporo (CMM), situada no polo micropilar, o nucelo (NU) e o tegumento primordial (TE). A área ampliada destaca a célula-mãe do megásporo. A barra representa 50 μ m.



Fonte: Do autor (2020).

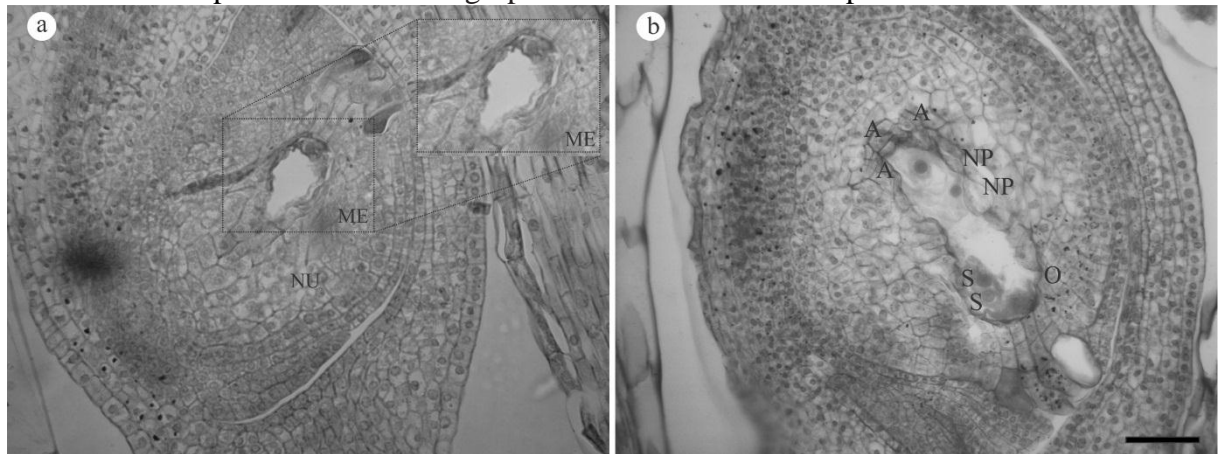
Os comprimentos das espiguetas para *U. ruzizensis* (5,39a) e *U. decumbens* (5,32a), no estágio final do desenvolvimento do saco embrionário, megagametogênese, também foram coincidentes, não diferindo entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Tabela 5). Por sua vez, para o diâmetro das espiguetas, na megagametogênese, a espécie *U. decumbens* (1,95a) apresentou maior comprimento das espiguetas em relação à espécie *U. ruzizensis* (1,65b) (Tabela 5).

Em *U. ruzizensis*, as espiguetas com 5,025 a 5,891 mm de comprimento e 1,224 a 1,930 mm de diâmetro foram associadas à megagametogênese. Por sua vez, para *U. decumbens* esse estágio foi observado em espiguetas nos comprimentos entre 5,069 e 5,811 mm e diâmetro entre 1,532 a 2,129 mm (Tabela 1).

A megagametogênese de *U. ruzizensis* se caracterizou pela presença do megásporo funcional aumentado, com presença de vacúolo, na região do pólo calazal (Figura 2a). As secções histológicas das espiguetas dessa espécie mostraram a formação do saco embrionário

do tipo *Polygonum*, com oito células reduzidas: dois núcleos polares ao centro, três antípodas, duas sinérgides e uma oosfera (Figura 2b).

Figura 2 - Secção longitudinal de ovários de *U. ruziziensis* cv. Kennedy (sexual) na megagametogênese, mostrando: a) megásporo funcional (ME) b) saco embrionário tipo *Polygonum* com oito células reduzidas: dois núcleos polares (NU) ao centro, três antípodas (A), duas sinérgides (S) e uma oosfera (O). A área ampliada destaca o megásporo funcional. A Barra representa 10 um.

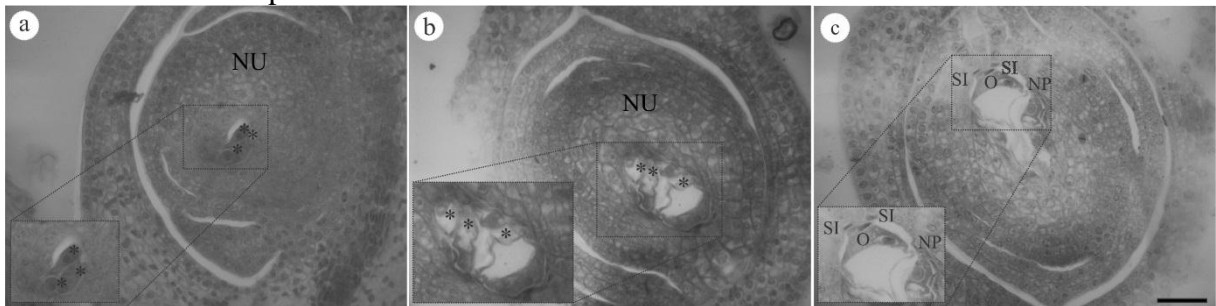


Fonte: Do autor (2020).

Para *U. decumbens*, por sua vez, na megagametogênese os quatro megásporos se degeneraram e uma ou mais células somáticas do nucelo se diferenciaram das demais, apresentando maior tamanho, núcleo proeminente, vacúolo e parede celular espessa, sendo denominadas células iniciais apospóricas (Figura 3a). A célula inicial apospórica aumenta de tamanho (Figura 3a, b), sofre duas divisões mitóticas sucessivas, formando um saco embrionário com quatro núcleos. A megagametogênese se caracterizou pela presença de óvulos com múltiplos sacos embrionários (Figura 3b) e sacos embrionários simples (Figura 3c). Nessa fase, foi observado o saco embrionário do tipo *Panicum*, típico das espécies que apresentam apomixia gametofítica, composto de apenas quatro células não reduzidas: uma oosfera, duas sinérgides e uma grande célula contendo os dois núcleos polares, localizada próximo da oosfera (Figura 3c).

No estágio de megasporogênese, tanto em *U. ruziziensis* como em *U. decumbens*, observou-se o início do desenvolvimento do tegumento interno e externo, estando esse já formado no estágio de megagametogênese (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 3 - Secção longitudinal de ovários de *U. decumbens* cv. Basilisk (apomítica) na megagametogênese, mostrando: a) células iniciais apospóricas no início da diferenciação a partir de células somáticas do nucelo (NU). A área ampliada destaca as iniciais apospóricas; b) ovário com três sacos embrionários (*) A área ampliada destaca os três sacos embrionários c) saco embrionário tipo *Panicum* composto de quatro células não reduzidas: uma oosfera (O), duas sinérgidas (S) e núcleos polares (NP). A área ampliada destaca o saco embrionário tipo *Panicum*. Barra representa 10 um.



Fonte: Do autor (2020).

4.2 Especificidade dos primers e eficiência da amplificação dos primers

Os genes de referência e alvo mostraram curvas de Melting com um único pico, indicando a alta especificidade dos primers (Figura 4). A eficiência da amplificação dos primers variou de 84,758% (BbrizSti1) a 99,976% (BbrizUBCE) (Tabela 5).

4.3 Análise de RT qPCR

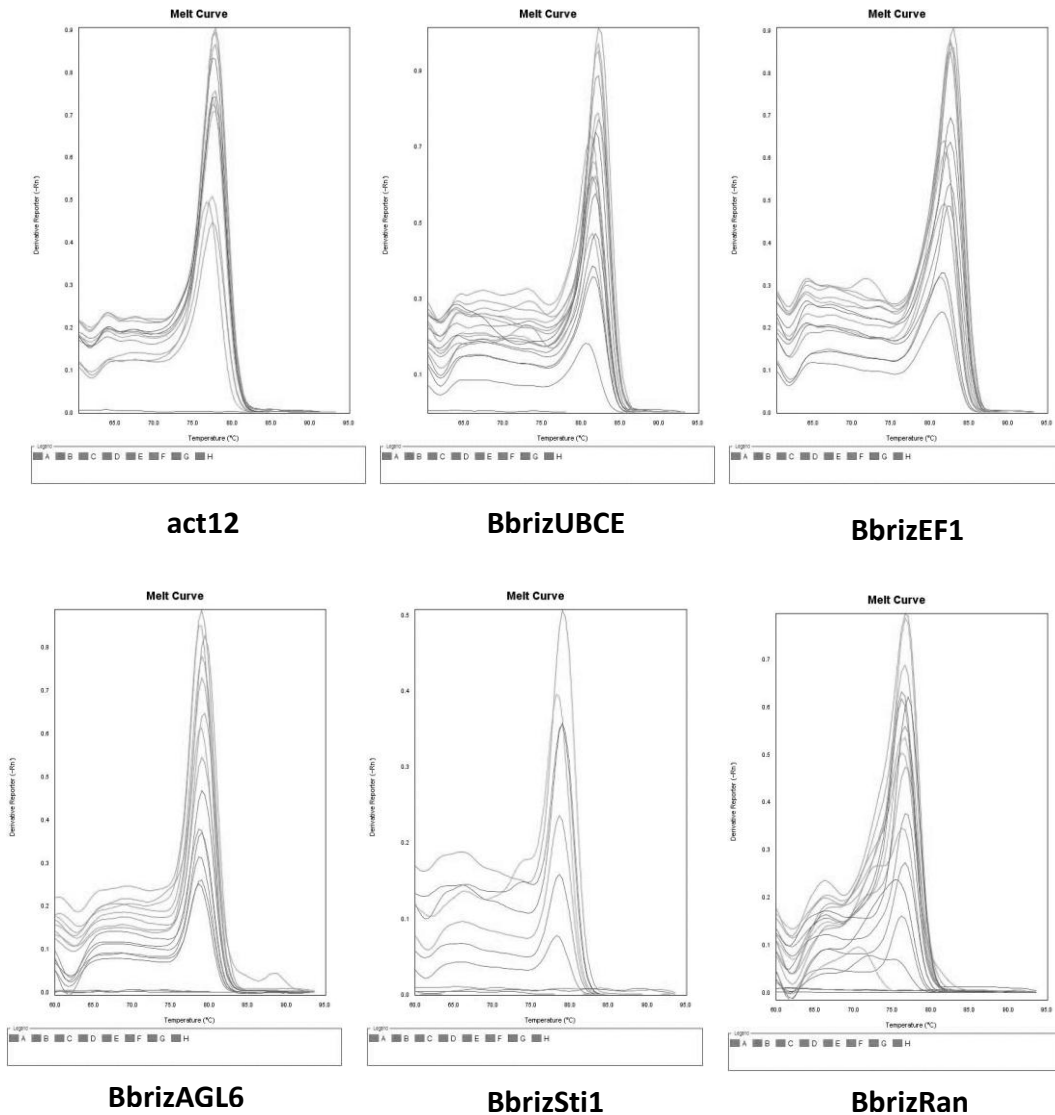
A expressão dos genes BbrizAGL6, BbrizSti1 e BbrizRan foi analisada utilizando RT qPCR nas espiguetas de *U. decumbens* e *U. ruziziensis* nos estágios de megagametogênese e megasporogênese (Figuras 5, 6 e 7).

O gene BbrizSti1, apresentou maior expressão na planta apomítica em relação à planta sexual na megasporogênese (Figura 5). Por outro lado, na megagametogênese, o nível de expressão foi alto tanto na espécie sexual quanto na apomítica (Figura 5).

O gene BbrizRan apresentou maior nível de expressão na planta apomítica em relação à planta sexual em ambos estágios de desenvolvimento (Figura 6). Nas duas espécies avaliadas, a expressão foi maior na fase megagametogênese em relação a megasporogênese.

Para o gene BbrizAGL6 foi observado um aumento nos níveis de expressão ao longo do desenvolvimento do saco embrionário, com maior expressão durante a megagametogênese de ambas as espécies. Não foram observadas diferenças na sua expressão ao longo do desenvolvimento e diferenciação floral (Figura 7).

Figura 4 - Curvas de Melting dos genes de referência BbrizEF1, BbrizUBCE e act12 e genes alvo BbrizAGL6, BbrizSti1 e BbrizRan.



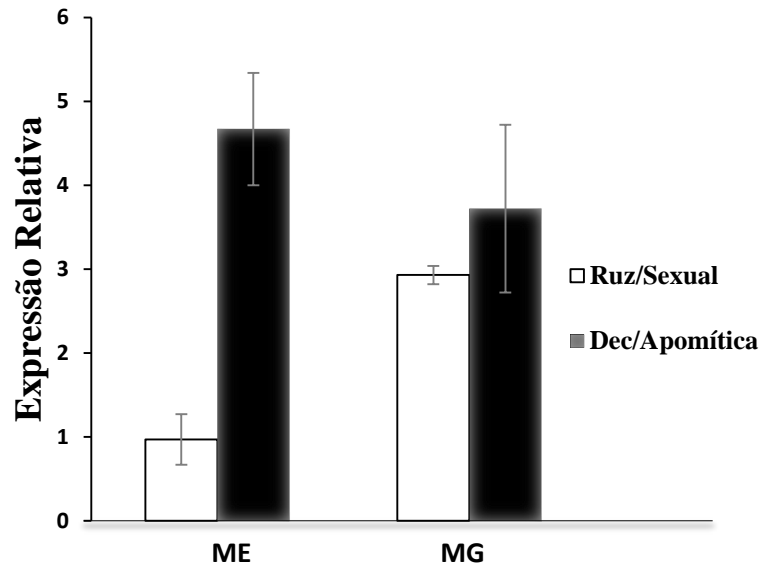
Fonte: Do autor (2020).

Tabela 6 - Eficiências da amplificação dos primers para os genes de referência (BbrizEF1, BbrizUBCE, act12) e alvo (BbrizAGL6, BbrizSti1, BbrizRan) utilizados na análise em tempo real de RT qPCR.

Eficiência da amplificação	
Genes de referência	
BbrizEF1	99,165
BbrizUBCE	99,976
Act12	96,689
Genes alvo	
BbrizAGL6	97,916
BbrizSti1	84,758
BbrizRan	95,951

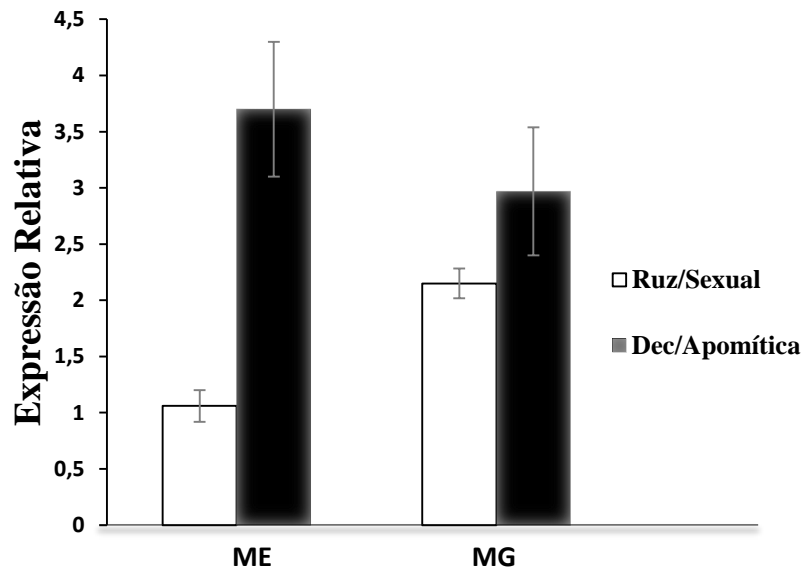
Fonte: Do autor (2020).

Figura 5 - Expressão relativa do gene BbrizSti1 em espiguetas de *U. ruzizensis* (barras brancas) e *U. decumbens* (barras pretas) na megasporogênese (ME) e megagametogênese (MG). Os genes BbrizEF1, BbrizUBCE e act12 foram utilizados como genes de referência (SILVEIRA et al., 2009; TAKAMORI et al., 2017). Barra (erro padrão da média).



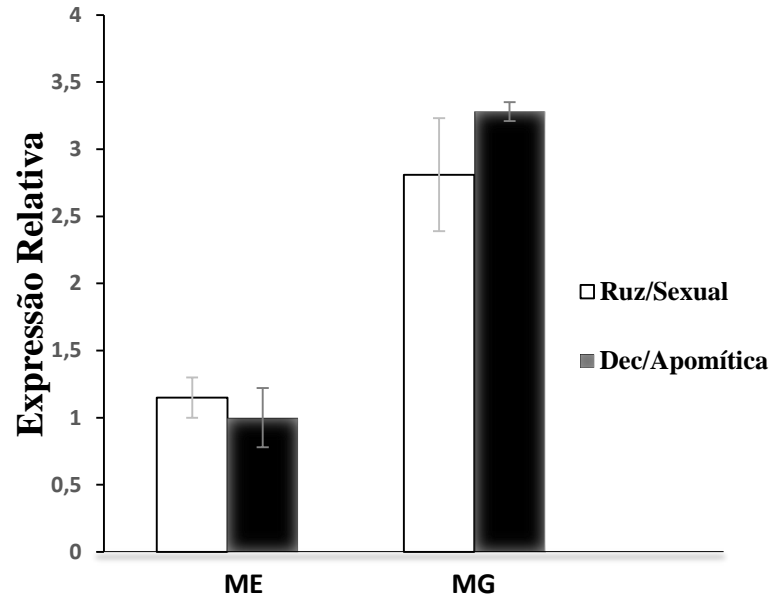
Fonte: Do autor (2020).

Figura 6 - Expressão relativa do gene BbrizRan em espiguetas de *U. ruzizensis* (barras brancas) e *U. decumbens* (barras pretas) na megasporogênese (ME) e megagametogênese (MG). Os genes BbrizEF1, BbrizUBCE e act12 foram utilizados como genes de referência (SILVEIRA et al., 2009; TAKAMORI et al., 2017). Barra (erro padrão da média).



Fonte: Do autor(2020)

Figura 7 - Expressão relativa do gene BbrizAGL6 em espiguetas de *U. ruzizensis* (barras brancas) e *U. decumbens* (barras pretas) na megasporogênese (ME) e megagametogênese (MG). Os genes BbrizEF1, BbrizUBCE e act12 foram utilizados como genes de referência (SILVEIRA et al., 2009; TAKAMORI et al., 2017). Barra (erro padrão da média).



Fonte: Do autor (2020).

5 DISCUSSÃO

5.1 Descrição dos estágios megasporogênese e megagametogênese associados aos caracteres morfométricos das espiguetas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o comprimento da espiguetas pode ser usado como um marcador morfológico confiável para discriminar os estágios da megasporogênese e megagametogênese em *U. ruziziensis* e *U. decumbens*. Estes resultados são interessantes pela sua aplicabilidade em trabalhos que tem por objetivo caracterizar a expressão de genes reprodutivos nas fases de desenvolvimento do saco embrionário ou que visem determinar o modo de reprodução. Por outro lado, o uso dos dados do diâmetro da espiguetas não é recomendável, tendo em vista que algumas medições foram comuns aos dois estágios.

A utilização de uma característica morfológica associada ao desenvolvimento do saco embrionário já foi empregada no milho, por Huang e Sheridan (1994). Esses autores associaram os eventos do desenvolvimento do saco embrionário com a característica morfológica externa comprimento do cabelo da espiga do milho, com o objetivo de obter um índice de desenvolvimento do saco embrionário ao longo do comprimento da espiga (HUANG; SHERIDAN, 1994; DAMASCENO, 2017).

Em *U. brizantha*, Araújo et al. (2000) combinaram as características morfológicas do estigma e o comprimento do pistilo com os estágios citológicos de formação do óvulo, para discriminação de plantas apomíticas e sexuais. Tal estudo foi um passo importante para a identificação de genes apomíticos nesta espécie (ALVES; CARNEIRO; DUSI, 2007; SILVEIRA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013; LACERDA et al., 2013; DAMASCENO, 2017; FERREIRA et al., 2018).

A semelhança observada no desenvolvimento da megasporogênese entre as espécies sexual (*U. ruziziensis*) e apomítica (*U. decumbens*) também já foi descrita em *U. brizantha* por Araújo et al. (2000), não apresentando, assim, características que possibilitem diferenciar o modo reprodutivo durante esse estágio.

A célula mãe de megásporo (CMM) em *U. ruziziensis* e *U. decumbens* encontra-se circundada pelo tecido nucelar, como já observado em espécies de *Urochloa* a exemplo de *U. brizantha* (ARAÚJO et al., 2004) e em outras espécies de Poaceae, a exemplo de *Olyra humilis* Nees e *Sucrea monophylla* Soderstr. (Bambusoideae), *Axonopus aureus* P. Beauv. e *Paspalum polyphyllum* Nees ex Trin. (Panicoideae), *Chloris elata* Desv. e *Eragrostis solida* Nees (Chloridoideae) (NAKAMURA; LONGHI-WAGNER; SCATENA, 2009). A célula

arquesporial ou CMM se diferencia das células do nucelo em tamanho e por apresentar núcleo aparente (NAKAMURA; LONGHI-WAGNER; SCATENA, 2009). A medida que se aproxima a divisão meiótica a CMM alonga-se e o citoplasma torna-se denso (NAKAMURA; LONGHI-WAGNER; SCATENA, 2009).

A célula mãe do megásporo sofre meiose e dá origem a uma tétrade linear, em *U. ruziziensis* (NAKAMURA; LONGHI-WAGNER; SCATENA, 2009). Nesta espécie, foram observados eventos tipicamente descritos para plantas com modo de reprodução sexual, nas quais se observam que três megásporos se degeneram e um torna-se funcional. O megásporo funcional, então, devido à formação de vacúolos, aumenta em volume, tendo o seu núcleo posicionado centralmente (NAKAMURA; LONGHI-WAGNER; SCATENA, 2009). No presente estudo, não foram observadas díades e tétrades, e os quatro megásporos. A dificuldade em selecionar espiguetas contendo todas as fases da meiose, sugere que esse processo ocorra rapidamente em *U. ruziziensis*.

Para *U. ruziziensis*, o megásporo aumenta de tamanho e sofre três mitoses sucessivas, formando um saco embrionário de oito núcleos (GOBBE; LONGGL; LOUANT, 1982). O saco embrionário encontrado na espécie *U. ruziziensis* é tipo *Polygonum*. Esse tipo é encontrado na maioria das angiospermas com reprodução sexual (GROSSNIKLAUS, 2001; LITUIEV; GROSSNIKLAUS, 2014; DAMASCENO, 2017), sendo composto por um ou dois núcleos polares ao centro, além de três antípodas, duas sinérgidas e uma oosfera.

Em espécies apomíticas, como *U. decumbens*, geralmente a meiose é interrompida e apenas um meiócito alongado é formado, posteriormente, este se degenera e células do nucelo passam a funcionar como células iniciais apospóricas (DUSI, 2001; DUSI; WILLEMSE, 1999). As células iniciais apospóricas aumentam seu tamanho e após duas mitoses, um saco embrionário de quatro núcleos é formado (DUSI, 2001; DUSI; WILLEMSE, 1999). Como observado no presente estudo, a diferença mais visível entre plantas apomíticas e sexuais está na composição dos sacos embrionários localizados dentro dos óvulos (CARNEIRO et al., 2003). Nesta espécie foi confirmado o saco embrionário apospórico do tipo *Panicum*, composto da oosfera na região micropilar, duas sinérgidas e a célula central com um núcleo polar (NAUMOVA; HAYWARD; WAGENVOORT, 1999; SAVIDAN, 2000; ARAUJO et al., 2004). A oosfera em sacos embrionários do tipo *Panicum* é frequentemente observada com maior tamanho, citoplasma denso e um núcleo grande (NAUMOVA; HAYWARD; WAGENVOORT, 1999).

As nossas avaliações em *U. decumbens* mostraram um saco embrionário apomítico por óvulo e também múltiplos sacos embrionários por óvulo, corroborando as descrições de Dusi

(2001) e Naumova, Hayward e Wagenvoort (1999). De acordo com Dusi (2001), as células iniciais apóspóricas presentes no nucelo se desenvolvem, frequentemente, após a degeneração do meiócito em *U. decumbens*. Em plantas apomíticas, a ocorrência de um ou mais sacos embrionários apomíticos coexistindo com o saco embrionário sexual em um óvulo é relatada, incluindo *U. decumbens* (NOGLER, 1984; NAUMOVA; HAYWARD; WAGENVOORT, 1999; ARAÚJO et al., 2000).

O desenvolvimento do tegumento interno e externo também foi usado na caracterização dos estágios de desenvolvimento para *U. ruziziensis* e *U. decumbens*, estando completamente formados no estágio de megagametogênese. Nakamura, Longhi-Wagner e Scatena (2009), avaliando espécies de Poaceae, incluindo *Axonopus aureus* P. Beauv. e *Paspalum polyphyllum* Nees ex Trin., que pertencem a mesma subfamília de *U. ruziziensis* e *U. decumbens*, Panicoideae, relataram o surgimento do tegumento interno antes do externo, sendo constituído de duas a três camadas celulares, que se dividem anticlinalmente e periclinalmente, envolvendo completamente o nucelo na megagametogênese.

Finalmente, Dusi (2001) desenvolveu um calendário reprodutivo para dois acessos de *U. decumbens*, BRA000191 (D58-cv. IPEAN), apomítico tetraploide e BRA004430 (D4), sexual diploide. Ele relacionou 11 classes de desenvolvimento do pistilo que foram determinadas a partir de seu comprimento, com o tempo em dias para a antese, a morfologia do pistilo e estágios de desenvolvimento do gametofítico feminino e masculino. Em seus resultados, observou-se que o crescimento da espiguetta acompanha o aumento do desenvolvimento do saco embrionário corroborando o presente estudo. Não obstante, nosso trabalho se diferencia por caracterizar os estágios de desenvolvimento do saco embrionário, megasporogênese e megagametogênese, combinando-os com o comprimento da espiguetta em *U. decumbens* cv. Basilisk e em *U. ruziziensis* cv. Kennedy.

5.2 Verificação da especificidade dos primers pela curva de melting e eficiência da amplificação dos primers

A presença de um pico nas curvas de Melting dos primers avaliados indicou a especificidade dos mesmos em relação às espécies *U. decumbens* e *U. ruziziensis*. A confirmação da especificidade dos primers é especialmente importante porque todos os genes avaliados foram obtidos a partir de ESTs de *U. brizantha*. Este resultado sugere que as sequências desses genes apresentam similaridade entre as espécies em estudo, o que indica para uma possível origem comum das mesmas. Trabalhos anteriores relatam elevada proximidade

genética das espécies *U. decumbens*, *U. ruziziensis* e *U. brizantha*, (CHIARI et al., 2008; PAULA; SOBRINHO; TECHIO, 2017). Estas espécies fazem parte de um mesmo complexo agâmico, o que significa dizer que, cruzamentos entre as mesmas podem ser realizados (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006; CHIARI et al., 2008; VALLE; PAGLIARINI, 2009; PAULA; SOBRINHO; TECHIO, 2017), o que também corrobora com a alta similaridade genética entre as espécies deste estudo. Além disso, ressalta-se que Renvoize; Clayton; Kabuye (1996), sugeriram, baseado em resultados de isoenzimas, que a cultivar *U. decumbens* cv. Basilisk, pertence, na realidade à espécie *U. brizantha*.

5.3 Análise de RT qPCR

O genes BbrizSti1 e BbrizRan foram mais expressos em *U. decumbens* durante a megasporogênese em relação à *U. ruziziensis*, sugerindo a importância desses genes para o início da diferenciação apomítica. Estes genes foram identificados previamente a partir de ESTs de bibliotecas de ovários na megasporogênese de *U. brizantha* e mostraram seu envolvimento nas etapas iniciais da diferenciação do saco embrionário do tipo *Panicum* conforme descrito por Silveira et al (2012).

BbrizSti1 pertence à superfamília STII. Consiste em uma proteína cochaperona multifuncional induzida por estresse (RÖHL et al., 2015) encontrada em uma diversidade de organismos como fungos (NICOLET; CRAIG, 1989), animais (KAUSAR et al., 2020) e plantas (ZHANG et al., 2003; LAMM et al., 2017).

A alta expressão de BbrizSti1 na megasporogênese de *U. decumbens* observada no presente estudo indica para o possível envolvimento de genes responsivos ao estresse, em vias de transdução de sinal levando células do nucelo a atuarem diretamente como células iniciais apospóricas, como já fundamentado no trabalho de Silveira et al. (2012).

Estudos prévios demonstraram a influência de diferentes condições de estresse na expressão da apomixia em plantas, especialmente na taxa de formação de sacos embrionários apomíticos ou sexuais, a exemplo do Capim-chorão (*Eragrostis curvula* [Schrad.] Nees) (RODRIGO et al., 2017) e Capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L. (*Pennisetum ciliare*) (GOUNARIS et al., 1991). Estes trabalhos sugerem controle epigenético na(s) região(s) genética(s) que condiciona(m) a apomixia (RODRIGO et al., 2017; FEI et al., 2019).

O gene BbrizRan, por sua vez, pertence à superfamília de proteína nuclear de ligação a GTP Ran (GTP-binding nuclear protein Ran). Atua principalmente em processos de transporte

nucleo-citoplasmáticos, formação do envelope nuclear e formação do fuso mitótico (DE BOOR et al., 2015). É possível que o gene *BbrizRan* em *U. decumbens* atue no transporte de proteínas importantes para desencadear os processos de diferenciação das células do nucelo em iniciais apospóricas (SILVEIRA et al. 2012).

O alto nível de expressão de *BbrizSti1* e *BbrizRan* na megagametogênese nas plantas sexuais e apomíticas avaliadas em nosso estudo, sugere o envolvimento dos mesmos no desenvolvimento reprodutivo, possivelmente, em mecanismos relacionados à formação do saco embrionário. No trabalho de Silveira et al. (2012), por outro lado, nos ovários das plantas sexuais, o gene *BbrizRan* apresentou fraca expressão e *BbrizSti1* não foi expresso nas plantas sexuais em nenhuma das fases de desenvolvimento, o que indica que a regulação desses genes é espécie-específica no gênero *Urochloa*.

O perfil de expressão durante o desenvolvimento do ovário apomítico de *U. brizantha* do gene *BbrizSti1* foi analisado por hibridização *in situ* (ISH) (SILVEIRA et al. 2012). Sinais de hibridização foram detectados em ovários desde a megasporogênese até a megagametogênese na planta apomítica, similar aos resultados obtidos no presente estudo. No início do desenvolvimento do ovário, Silveira et al. (2012) mostraram que os sinais da ISH do gene *BbrizSti1* foram detectados na célula mãe do megásporo e células nucleares circundantes. No estágio final de desenvolvimento, os sinais de hibridização foram detectados nos tegumentos e células nucleares, com um sinal fraco em sinérgides, núcleo polar e oosfera.

Os resultados do presente estudo confirmaram a atuação do gene *BbrizAGL6* no desenvolvimento reprodutivo de *U. decumbens* apomítica e *U. ruziziensis* sexual. A expressão desse gene aumentou ao longo do desenvolvimento das espiguetas, apresentando maior nível de expressão na megagametogênese. Esse resultado divergiu do relatado por Guimarães et al. (2013), em que o gene *BbrizAGL6* foi modulado diferencialmente nos ovários de *U. brizantha*, sendo observada maior expressão para o genótipo sexual em comparação com o genótipo apomítico na megasporogênese e megagametogênese.

No entanto, no mesmo estudo desenvolvido por Guimarães et al. (2013) os transcritos desse gene foram localizados na célula mãe do megásporo de ovários de plantas apomíticas e sexuais e, adicionalmente, na região onde as células iniciais apospóricas se diferenciam nas plantas apomíticas. Estes resultados evidenciam a atuação desse gene no desenvolvimento apomítico e sexual, corroborando o presente estudo. Importantes genes associados à apomixia são expressos tanto em plantas sexuais como em plantas apomíticas, a exemplo do gene *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) e do gene *GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1* (*GID1*). O gene *SERK* (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase), na meiose do

genótipo apomítico de *Paspalum notatum* Flügger, é expresso em células nucleares, mas no genótipo sexual é expresso na célula mãe do megásporo (PODIO et al., 2014a). O gene *GID1* é um receptor de giberelina e sua expressão foi associada com o desenvolvimento do óvulo de plantas apomíticas e sexuais de *U. brizantha* (FERREIRA et al., 2018). De acordo com Ferreira et al. (2018) o nível de expressão desse gene foi maior em ovários na megasporogênese do que nos ovários na megagametogênese de plantas sexuais e apomíticas. Esse gene foi detectado na célula mãe do megásporo de *U. brizantha* sexual e apomítica e nas células nucleares apenas nas plantas apomíticas (FERREIRA et al., 2018).

BbrizAGL6 é um gene pertencente à família de MADS-box tipo MIKC, AGAMOUS-LIKE 6 (*AGL6*) identificado em *U. brizantha* (GUIMARÃES et al., 2013). Os genes MADS-box integram diferentes vias do florescimento (TEO; ZHOUE; SHEN, 2019). O trabalho de Reinheimer; Kellogg (2009) relatou que em gramíneas, genes do tipo *AGL6* são expressos em óvulos, lodículos, páleas e meristemas florais.

Finalmente, o melhor entendimento de como os genes *BbrizSti1*, *BbrizRan*, *BbrizAGL6* atuam depende da realização de pesquisas complementares nas espécies *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, especialmente visando determinar o perfil de expressão dessas sequências utilizando ISH.

Os resultados obtidos na RT-qPCR em nosso estudo confirmaram a eficiência do uso da característica morfológica comprimento da espiguetas, na determinação das fases de desenvolvimento do saco embrionário, megasporogênese e megagametogênese. De acordo com Silveira et al. (2012), o uso de estruturas florais como o ovário em estudos que visem a caracterização da expressão diferencial de plantas apomíticas e sexuais em gramíneas, dificulta a realização do trabalho, devido principalmente ao tamanho reduzido do ovário, presença de apenas um ovário por flor e a dificuldade de excisão do mesmo das estruturas florais. Com isso, o uso das espiguetas como sugerido no presente estudo pode facilitar a realização desses trabalhos.

Pesquisas que visam identificar genes que são expressos específica ou diferencialmente durante a formação do saco embrionário e embriogênese são a chave para o entendimento dos mecanismos de formação do embrião apomítico e, dessa forma, fundamentais para se alcançar a manipulação da apomixia (FEI et al., 2019). Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos, especialmente para a espécie *U. brizantha* (ALVES; CARNEIRO; DUSI, 2007; SILVEIRA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013; LACERDA et al., 2013; FERREIRA et al., 2018). Contudo, os mecanismos moleculares que desencadeiam a apomixia ainda permanecem desconhecidos (FEI et al., 2019; SCHMIDT, 2020).

A espécie *U. decumbens* é uma forrageira de elevada importância econômica, que apresenta atributos vantajosos como a adaptabilidade a solos de baixa fertilidade, sendo foco juntamente com outras espécies, dos mais importantes programas para o melhoramento de espécies forrageiras em andamento no CIAT (Colômbia) e na EMBRAPA (Brasil) (SAVIDAN 2000). Contudo, trabalhos que visem identificar genes envolvidos na manifestação da apomixia ao longo do desenvolvimento reprodutivo ainda são escassos em *U. decumbens*, evidenciando a importância do presente trabalho como um dos primeiros a estudar a regulação de genes associados a apomixia nessa espécie.

Tendo em vista a maior expressão do gene *BbrizRan* na megasporogênese e megagametogênese e *BbrizStil* na megasporogênese nas plantas apomíticas, *U. decumbens* e *U. brizantha*, os genes *BbrizRan* e *BbrizStil* poderão ser úteis na determinação do modo reprodutivo nestas espécies.

6 CONCLUSÃO

O comprimento da espiguetta pode ser usado como um marcador morfológico confiável para discriminar os estágios da megagametogênese e megasporogênese em *U. ruzizensis* cv. Kennedy (diploide, sexual) e *U. decumbens* cv. Basilisk (tetraploide, apomítica).

Os genes *BbrizRan*, *BbrizStil* e *BbrizAGL6* atuam no desenvolvimento reprodutivo de *U. decumbens* (apomítica) e *U. ruzizensis* (sexual).

O gene *BbrizSti1* está envolvido no estágio inicial da diferenciação apomítica em *U. decumbens*.

O gene *BbrizRan* atua nos estágios inicial e final da diferenciação apomítica em *U. decumbens*.

As informações obtidas neste estudo servirão como ferramentas importantes para a realização de novos trabalhos para melhor compreensão tanto da apomixia quanto da reprodução sexual em *Urochloa*.

REFERÊNCIAS

- ABRASEM. Associação Brasileira de Sementes e Mudras. **Anuário 2016**. 2016. Disponível em: http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2013/09/Anuario_ABRASEM_2016_SITE.pdf. Acesso em: 10 abril. 2020.
- AKIYAMA, Y. et al. Evolution of the apomixes transmitting chromosome in *Pennisetum*. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 289, 2011.
- ALBERTINI, E. et al. Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis* L. **Plant molecular biology**, v. 56, n. 6, p. 879-894, 2004.
- ALBERTINI, E. et al. SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. **Plant Physiology**, v. 138, n. 4, p. 2185-2199, 2005.
- ALCÂNTARA, P. B. BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas & leguminosas**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1988. 162p.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAUJO, A. C. G. Direct evidence of pseudogamy in an *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.
- ALVES, S. J. et al. **Espécies forrageiras recomendadas para produção animal**. Londrina: Fundeprec, 2008. Disponível em: http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/zootecnia/ANACLAUDIARUGGIERI/especies_forrageiras.pdf. Acesso em maio de 2016.
- ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A.; XAVIER, D. F. **As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no país**. Embrapa Gado de Leite, Embrapa Circular Técnica, 22, Juiz de Fora, 2002. p. 23.
- ARAUJO, A. C. et al. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales Le Botaniste**, v. 23, n. 1-2, p. 13-26, 2000.
- ARAUJO, A. C. G. et al. **Identificação de acessos de *Brachiaria* com interesse ao estudo da apomixia facultativa**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Boletim de Pesquisa, 74, Brasília, 2004. p. 29.
- ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato (*Brachiaria* híbrido CIAT36061) Gramínea de alta producción y calidad forrajera para los trópicos**. Centro de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 2005. p. 28.

ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato II (*Brachiaria* hybrid CIAT 36087): A high-quality forage grass, resistant to spittlebugs and adapted to well-drained, acid tropical soils.** Centro de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, 2007. p. 21.

ASSIS, G. M. L. de et al. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres Morfológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.

ASSIS, G. M. L. de. Melhoramento genético de forrageiras tropicas: importância e complexidade. In: GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. **Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia.** Rio Branco: Embrapa Acre, 2009. p. 209-220. Disponível em: http://iquiri.cpaefac.embrapa.br/pdf/livro_ufac.pdf. Acesso em: 10 jun. 2016.

BARBOSA, R. A. BRS Tupi: *brachiaria humidicola*. Brasília:Unipasto, 2012. Acesso em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77436/1/Folder-Tupi-Junho2012-CV.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2020.

BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios-Cambridge**, v. 104, n. 407, p. 157-171, 2001.

BICKNELL, R. A.; KOLTUNOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. **The Plant Cell**, v. 16, n. suppl 1, p. S228-S245, 2004.

BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, v. 85, n. 3, p. 225-228, 2006.

BRUKHIN, V. Molecular and genetic regulation of apomixis. **Russian journal of genetics**, v. 53, n. 9, p. 943-964, 2017.

CARNEIRO, V. T. C. et al. **Contribuição da biotecnologia ao domínio da apomixia de *Brachiaria* sp.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Comunicado técnico, 95, Brasília, 2003. p. 4.

CHAUDHURY, A. M. et al. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 4223-4228, 1997.

CHIARI, L. et al. **Variabilidade genética em acessos e cultivares de quatro espécies de *Brachiaria* estimada por marcadores RAPD.** Embrapa Gado de Corte, Embrapa Boletim de Pesquisa, 24, Campo Grande, 2008. p. 20.

CONNER, J. A. et al. Sequence analysis of bacterial artificial chromosome clones from the apospory-specific genomic region of *Pennisetum* and *Cenchrus*. **Plant physiology**, v. 147, n. 3, p. 1396-1411, 2008.

CONNER, J. A. et al. A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 36, p. 11205-11210, 2015.

- CORRAL, J. M. et al. A conserved apomixis-specific polymorphism is correlated with exclusive exonuclease expression in premeiotic ovules of apomictic *Boechera* species. **Plant physiology**, v. 163, n. 4, p. 1660-1672, 2013.
- CRUZ, R. P. DA; FEDERIZZI; L. C.; MILACH, S. C. K. A apomixia no melhoramento de plantas. **Ciencia Rural**, v. 28, n. 1, p. 155-161, 1998. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384781998000100028&lng=pt&nrm=iso> Acesso: 14 maio 2020.
- DAMASCENO, A. G. **Caracterização dos estágios de formação do saco embrionário em espécies de *Urochloa* e associação com as características morfológicas da espiguetta.** 2018. 35 p. Monografia (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- DE BOOR, S. et al. Small GTP-binding protein Ran is regulated by posttranslational lysine acetylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. E3679-E3688, 2015.
- DUSI, D. M. A. **Apomixis in *brachiaria decumbens* stapf.** 2001. 167p. Tese (Doutorado) - Wageningen Universiteit,, Universiteit, 2001. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/174961/1/ID-18767-1.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botânica**, v. 41, p. 151-162, 1999.
- FEI, X. et al. The steps from sexual reproduction to apomixis. **Planta**, v. 249, n. 6, p. 1715-1730, 2019.
- FERREIRA, L. G. et al. **GID1 expression is associated with ovule development of sexual and apomictic plants.** **Plant cell reports**, v. 37, n. 2, p. 293-306, 2018.
- GOBBE, J.; LONGLY, B.; LOUANT, B. P. Calendrier des sporogénèses et gamétogénèses femelles chez le diploïde et le tétraploïde induit de *Brachiaria ruziziensis* (Graminée). **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 2032-2036, 1982.
- GOUNARIS, E. K. et al. Inorganic salts modify embryo sac development in sexual and aposporous *Cenchrus ciliaris*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 4, n. 3, p. 188-192, 1991.
- GROSSNIKLAUS, U. From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches from sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering.** El Batan: CIMMYT, 2001. p. 168-211.
- GUIMARÃES, L. A. **Caracterização de genes AGAMOUS, SEPALLATA e AGL6 de *Brachiaria brizantha*, visando compreender a reprodução por apomixia.** 2012. 91 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/11182/1/2012_LarissaArraisGuimaraes.pdf Acesso em: 20 jul. 2017.

GUIMARÃES, L. A. et al. BbrizAGL6 is differentially expressed during embryo sac formation of apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* plants. **Plant molecular biology reporter**, v. 31, n. 6, p. 1397-1406, 2013.

HUANG, B. Q.; SHERIDAN, W. F. Female gametophyte development in maize: microtubular organization and embryo sac polarity. **The Plant Cell**, v. 6, n. 6, p. 845-861, 1994.

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

KAUSAR, S. et al. Biotic and abiotic stress induces the expression of Hsp70/90 organizing protein gene in silkworm, *Bombyx mori*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 610-618, 2020.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The plant cell**, v. 5, n. 10, p. 1425-1437, 1993.

KUMAR, S. **Epigenetic control of apomixis: a new perspective of an old enigma**. Advances in Plants & Agriculture Research, v. 7, n. 243, p. 10.15406, 2017.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário de 2017**. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/estabelecimentos.html. Acesso em: 10 abril 2020.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, v. 5, p. 164-170, 2009.

JANK, L. et al. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132-1137, 2014.

LACERDA, A. L. M. ***Brachiaria brizantha*: Caracterização de cDNA de ovários e identificação de explantes para transformação via biobalística**. 2007. 96 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/11182/1/2012_LarissaArraisGuimaraes.pdf Acesso em: 20 jul. 2017.

LACERDA, A. L. M. 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.

LAMM, C. E. et al. Hop/Sti1—a two-faced cochaperone involved in pattern recognition receptor maturation and viral infection. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1754, 2017.

- LITUIEV, D. S.; GROSSNIKLAUS, U. Patterning of the angiosperm female gametophyte through the prism of theoretical paradigms. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 2, p. 332-339, 2014.
- MACHADO, L. A. Z. et al. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. In: PIRES, A. V. (Ed.). **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2010. p. 375-417.
- MILES, J. W.; VALLE, C. B. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. **Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement**. Cali, Colombia: CIAT Publication, 1996. p. 164-178.
- NAKAMURA, A. T.; LONGHI-WAGNER, H. M. L.; SCATENA, V. L. Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 1, p. 165-176, 2009.
- NAUMOVA, T. N. **Apomixis in angiosperms: nucellar and integumentary embryony**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 144 p.
- NAUMOVA, T. N.; HAYWARD, M. D.; WAGENVOORT, M. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 43-52, 1999.
- NICOLET, C. M.; CRAIG, E. A. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 9, p. 3638-3646, 1989.
- NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1984. p. 475-518.
- NUNES, S. G. et al. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Embrapa Gado de Corte, Embrapa Documentos, 21, Campo Grande, 1984. p. 31p.
- LUO, M. et al. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 1, p. 296-301, 1999.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue-O. **Protoplasma**, v. 59, p. 69-76, 1964.
- OHAD, N. I. R. et al. A mutation that allows endosperm development without fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, p. 5319-5324, 1996.
- OHAD, N. I. R. et al. Mutations in FIE, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. **The Plant Cell**, v. 11, n. 3, p. 407-415, 1999.
- OZIAS-AKINS, P.; ROCHE, D.; HANNA, W. W. Tight clustering and hemizygoty of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 5127-5132, 1998.

- PAULA, C. M. P. DE; SOBRINHO, F. S; TECHIO, V. H. Genomic constitution and relationship in *Brachiaria* (Poaceae) species and hybrids. **Crop Science. Crop Science**, v. 57, n. 5, p. 2605-2616, 2017.
- PÉSSINO, S. C. et al. A genetic map of the apospory-region in *Brachiaria* hybrids: identification of two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, v. 128, p. 153-158, 1998.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- PODIO, M. 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, 2014a.
- PODIO, M. et al. A methylation status analysis of the apomixis-specific region in *Paspalum* spp. suggests an epigenetic control of parthenogenesis. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 22, p. 6411-6424, 2014b.
- RAVI, M.; MARIMUTHU, M. P.; SIDDIQI, I. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1121-1124, 2008.
- R Development Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- REINHEIMER, R.; KELLOGG, E. A. Evolution of AGL6-like MADS box genes in grasses (Poaceae): ovule expression is ancient and palea expression is new. **The Plant Cell**, v. 21, n. 9, p. 2591-2605, 2009.
- RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *brachiaria* (Trin.) Griseb. In. MILES, J. W.; MAASS, B. L., VALLE, C. B. **Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement**. Cali, Colombia: CIAT Publication, 1996. p. 1-15.
- RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; do VALLE, C. B. Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 522-527, 2005.
- RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 1, p. 7-10, 2006.
- RODRIGO, J. M. et al. Apomixis frequency under stress conditions in weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175852, 2017.
- RODRIGUES, J. C. et al. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant molecular biology**, v. 53, n. 6, p. 745-757, 2003.

RÖHL, A. et al. Hsp90 regulates the dynamics of its cochaperone Sti1 and the transfer of Hsp70 between modules. **Nature communications**, v. 6, n. 6655, 2015.

SAILER, C.; SCHMID, B.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis allows the transgenerational fixation of phenotypes in hybrid plants. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. 331-337, 2016.

SAVIDAN, Y. Genetics and utilization of apomixis for the improvement of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). In: SMITH, J. A.; HAYS, V. W. **Proceedings of the XIV International Grassland Congress**. New York/USA: Taylor & Francis Group, 1983. p. 182-184.

SAVIDAN, Y. Apomixis: Genetics and Breeding. In: ASKEW, R. BLISS, F. A. GILBERT, M. **Plant breeding reviews**. New York/USA: John Wiley & Sons, v. 18, 2000. p. 13-86.

SCHINDELIN, J. et al. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. **Molecular reproduction and development**, v. 82, n. 7-8, p. 518-529, 2015.

SCHMIDT, A. et al. Apomictic and sexual germline development differ with respect to cell cycle, transcriptional, hormonal and epigenetic regulation. **PLoS Genet**, v. 10, n. 7, p. e1004476, 2014.

SCHMIDT, A. Controlling apomixis: Shared features and distinct characteristics of gene regulation. **Genes**, v. 11, n. 3, p. 329, 2020.

SILVEIRA, É. D. et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 84, 2009.

SILVEIRA, E. D. 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 Rep**, v. 31, n. 2, p. 403-416, 2012.

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

SINGH, M. et al. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an ARGONAUTE protein. **The Plant Cell**, v. 23, n. 2, p. 443-458, 2011.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2. ed. Boca Raton London New York Washington: CRC PRESS, 2002.

SOUSA SOBRINHO, F. S. et al. Melhoramento genético de *Brachiaria ruziziensis*: histórico e estratégias. In: MARTINS, C. B.; DEMINICIS, B. B.; MOREIRA, G. R.; MENDONÇA, P. P. **Tópicos especiais em Ciência Animal IV**. 1. ed. Alegre: CAUFES, 2016. p. 309-327.

Disponível em:

http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/sites/cienciasveterinarias.ufes.br/files/field/anexo/livro_teca_iv_2016_0.pdf. Acesso: 21 ago. 2017.

- SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F. J. da S.; KOPP, M. M. Estacionalidade e estabilidade de produção de forragem de progênies de *Brachiaria ruziziensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 685-691, 2011.
- STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 14, July 2017. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 08 abril de 2020.
- TAKAMORI, L. M. et al. Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR expression analysis in *Urochloa brizantha* under abiotic stresses. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- TEO, Z. W. N.; ZHOU, W.; SHEN, L. Dissecting the function of MADS-Box transcription factors in orchid reproductive development. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1474, 2019.
- TIMBÓ, A. L. de O. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 3, p. 127-131, 2014.
- THAIKUA, S. et al. Tightly clustered markers linked to an apospory-related gene region and quantitative trait loci mapping for agronomic traits in *Brachiaria* hybrids Japanese. **Society of Grassland Science**, Grassland Science, v. 62, p. 69-80, 2016.
- TORRES GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, p. 36-44, 2005.
- TOWNSEND, C. R. et al. **Cigarrinhas-das-pastagens em Rondônia: diagnóstico e medidas de controle**. Embrapa Agroflorestal de Rondônia, Embrapa Documentos, 53, Porto Velho, 2001. p. 29.
- VALLE, C. B. **Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Embrapa Gado de Corte, Embrapa Documentos, 46, Campo Grande, 1990. p. 33.
- VALLE, C. B. Gênero *Brachiaria*. In: FONSECA, D. M. da; MARTUSCELLO, J. A. **Plantas forrageiras**. Viçosa. Editora UFV, 2010. p. 30-77.
- VALLE, C. B. ***Brachiaria* e/ou *Urochloa*: dando nomes às plantas**. 2010. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=22378&secao=Colunas%20e%20Artigos>. Acessado em: 12 de maio de 2016
- VALLE, C. B. do et al. *Brachiaria brizantha* cv. Piatã: uma forrageira para a diversificação de pastagens tropicais. **Seed News**, v. 11, n. 2, p. 28-30, 2007.
- VALLE, C. B. do et al. BRS Paiaguás: A new *Brachiaria* (*Urochloa*) cultivar for tropical pastures in Brazil. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 1, n. 1, p. 121-122, 2013.
- VALLE, C. B. do et al. **BRS Ipyporã (" belo começo" em guarani): híbrido de *Brachiaria* da Embrapa**. Embrapa Gado de Corte, Embrapa Comunicado Técnica, 137, Campo Grande, 2017. p. 17.

- VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 460-472, 2009.
- VALLE, C. B.; MILES, J. W. Breeding of apomixis species. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J.G.; DRESSELHAUS, T. **The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering**. El Batan: CIMMYT, 2001. p. 137-152.
- VALLE, C.B.; PAGLIARINI, M.S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: SINGH, R.J., ed. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Boca Raton. CRC Press, 2009. p. 103–151.
- VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS B.L.; VALLE, C.B., eds. **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali. CIAT/EMBRAPA, 1996. p. 147-163.
- ZHANG, Z. et al. Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. **Plant physiology**, v. 131, n. 2, p. 525-535, 2003.
- ZORZATTO, C. et al. Identification of a molecular marker linked to apomixis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Plant Bred**, v. 129, p. 734–736, 2010.
- ZULOAGA, F. O. et al. Catalogue of new world grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 46, p. 1-662, 2003.
- WORTHINGTON, M. et al. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics**, v. 203, n. 3, p. 1117-1132, 2016.

APÊNDICE A - Perfil eletroforético de amostras de RNAs tratados com DNase obtidas a partir de espiguetas de *U. decumbens* cv. Basilisk e *U. ruziziensis* cv. Kennedy em gel de agarose 1%. As bandas observadas, de cima para baixo, são os RNAs 28S, 18S e 5,8S.

