

Avanços da biotecnologia da apomixia em braquiária e perspectivas para inovação



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura e Pecuária***

DOCUMENTOS 384

Avanços da biotecnologia da apomixia em braquiária e perspectivas para inovação

*Vera Tavares de Campos Carneiro
Júlio Carlyle Macedo Rodrigues
Gláucia Barbosa Cabral
André Southernman Teixeira Irsigler
Diva Maria de Alencar Dusi*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Parque
Estação Biológica – PqEB
Av. W5 Norte (final)
CEP: 70770-917 Brasília, DF
Fones: (61) 3448-4700 / (61) 3448-4739
www.embrapa.br
<https://embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê Local de Publicações da
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Presidente
Marcelo Lopes da Silva

Secretária-Executiva
Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros
*Andrielle Câmara Amaral Lopes; Bruno Machado
Teles Walter; Débora Pires Paula;
Edson Junqueira Leite; Marcos Aparecido Gimenes;
Solange Carvalho Barrios Roveri José*

Revisão de texto
Jackcélia Costa

Normalização bibliográfica
Rosameres Rocha Galvão (1/2122)

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Cíntia Pereira da Silva

Foto da capa
Vera Tavares de Campos Carneiro

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Avanços da biotecnologia da apomixia em braquiária e perspectivas de inovação /
Vera Tavares de Campos Carneiro ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, 2023. il. Color.

PDF (19 p.) : il. color - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, ISSN 0102-0101; 384).

1. Variabilidade genética. 2. Forrageira. I. Carneiro, Vera Tavares de Campos.
II. Rodrigues, Júlio Carlyle Macedo. III. Cabral, Glauca Barbosa. IV. Irsigler, André
Southernman Teixeira. V. Dusi, Diva Maria de Alencar. VI. Série.

CDD (21. ed.) 631.52

Autores

Vera Tavares de Campos Carneiro

Bióloga, doutora em Biologia Celular e Molecular Vegetais, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Júlio Carlyle Macedo Rodrigues

Biólogo, doutor em Biologia Molecular de Plantas, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Glaucia Barbosa Cabral

Engenheira-agrônoma, doutora em Energia Nuclear na Agricultura, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

André Southernman Teixeira Irsigler

Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Diva Maria de Alencar Dusi

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciências de Plantas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Apresentação

O avanço do conhecimento científico demonstra ser fundamental para a agricultura brasileira, gerando maior qualidade e eficiência na produção pela introdução de novas tecnologias que buscam beneficiar maior número de pessoas e preservar a sustentabilidade ambiental. A introdução de ferramentas da biotecnologia no melhoramento genético amplia seu alcance em diversas áreas da pesquisa.

Diferentes produtos representam o sucesso da agricultura no Brasil, por seu valor bruto de produção, sendo os principais: a soja; seguida da carne bovina; milho; leite, frango. As pastagens de braquiária mostraram ser essenciais ao sucesso da criação de gado no Brasil, visto que a maior parte dos animais é criada a pasto. As forrageiras originárias da África, foram introduzidas no Brasil nos anos 60. Em 1984, a Embrapa lançou o acesso *Brachiaria brizantha* cv. Marandu que ainda hoje é cultivado em extensa área de pastagens.

A Embrapa investe em diversas linhas da pesquisa relacionadas ao melhoramento genético de forrageiras, no qual a demanda de diversificação das pastagens é um ponto importante. A equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem pesquisando a biotecnologia da apomixia em braquiária, visando ampliar a variabilidade genética dessas forrageiras pelo domínio de seu modo principal de reprodução, reprodução assexual por apomixia. Na reprodução apomítica são gerados clones idênticos à planta mãe por meio de sementes, acarretando baixa diversidade genética.

É com satisfação que apresentamos esse trabalho, na certeza que contribuirá à compreensão do modo de reprodução de braquiária e ao incremento da pesquisa na área. Nele é narrado o avanço do conhecimento da apomixia de braquiária, resultante do trabalho da equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em diferentes projetos de colaboração, e suas referências bibliográficas associadas. São descritos os principais processos do desenvolvimento reprodutivo de braquiária, identificados por sua associação com a apomixia, as metodologias, os bancos genéticos e genes associados ao desenvolvimento reprodutivo.

Maria Cléria Valadares Inglis

Chefe-Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	6
Estabelecimento de campos experimentais para estudos biotecnológicos	7
Caracterização de processos associados ao desenvolvimento reprodutivo de braquiária	8
Bancos genômicos de RNA e micro RNA	9
Perfil de expressão gênica na reprodução apomítica e sexual	10
Metodologias desenvolvidas	12
Considerações finais	14
Referências	15

Introdução

Na natureza, as plantas podem se reproduzir de modo sexual ou assexual. Na reprodução sexual novas combinações genéticas são geradas, aumentando as chances de sobrevivência das espécies, pois a variabilidade genética pode gerar indivíduos mais aptos à sobrevivência em ambientes diversos. Na reprodução assexual, clones são produzidos a partir de partes da planta como caules, raízes, folhas rizomas, brotos, bulbos e tubérculos ou por apomixia, na qual os clones da planta-mãe são gerados a partir de sementes. Em plantas apomíticas, embriões são derivados diretamente de células somáticas dos óvulos, apomixia esporofítica, ou por desenvolvimento autônomo da oosfera, semelhante à partenogênese, de gametófitos femininos não reduzidos, apomixia gametofítica.

No melhoramento genético de plantas, a reprodução sexual permite a introdução de novas características por cruzamentos controlados, levando à geração de híbridos com as qualidades de interesse. Perpetuar e multiplicar estes híbridos, por meio da apomixia, possibilitando sua propagação por meio de sementes é um grande desafio da biotecnologia e do melhoramento genético. O potencial de aplicação da apomixia na agricultura abrange a fixação de genótipos superiores, via semente apomítica, a produção em massa de genótipos economicamente importantes pela facilidade em produzir híbridos sem necessidade de emasculação ou isolamento. A identificação de genes associados diretamente a este processo abre a possibilidade de promover sua expressão em diferentes espécies, sendo considerada como um ponto de extrema importância em culturas de interesse comercial, pela possibilidade de levar genótipos de diferentes espécies a clonagem por meio de sementes (Fiaz et al., 2021). Vários grupos de pesquisa no mundo têm trabalhado na pesquisa da apomixia, em diferentes espécies (Hand; Koltunow, 2014; Mancini et al., 2014; Conner et al., 2015; Ronceret; Vielle-Calzada, 2015; Sailer et al., 2016; VanDijk et al., 2016; Albertini et al., 2019; Fei et al., 2019; Hojsgaard, 2020; Fiaz et al., 2021). No Brasil, na Embrapa, o estudo da apomixia tem sido principalmente focado em braquiária (Vigna et al., 2016; Cabral et al., 2018). Essas forrageiras apresentam importância estratégica para o Brasil pela dimensão da área utilizada para pastagem bovina, sendo a maior parte de variedades apomíticas, ou seja de baixa diversidade (Miles et al., 1996; Valle; Savidan, 1996; Araújo et al., 2008; Valle et al., 2009).

No Brasil, algumas espécies de braquiária, gramíneas oriundas da África, mostraram excelente adaptação às nossas condições de cultura (Valle et al., 2004) e ocupam a maior parte da área de pastagens cultivadas no País, mantendo a criação de um rebanho bovino estimado em 209 milhões de cabeças (Araújo et al., 2008; Jank et al., 2014). Grande parte das espécies de braquiária se reproduz por apomixia (Valle et al., 2004). A reprodução sexual, por meio da recombinação de alelos dos progenitores, promove a variabilidade genética. No caso da reprodução assexual, não ocorre a recombinação genética e são gerados novos indivíduos idênticos àqueles que os originaram. No caso das plantas apomíticas de braquiária, normalmente os cruzamentos com plantas sexuais é dificultado, não só pela apomixia, mas também pela diferença de ploidia entre as plantas sexuais e apomíticas. As pesquisas em apomixia visam permitir o controle da reprodução em plantas sexuais e apomíticas, por diferentes técnicas de mutagênese, engenharia genética ou edição gênica, entre outras (Hojsgaard, 2020). O sucesso dessa estratégia viabilizará a modificação do modo de reprodução e obtenção de novas variedades de plantas de interesse, a partir de plantas sexuais ou apomíticas.

A pesquisa dos mecanismos celulares e moleculares da reprodução sexual e apomítica é realizada principalmente na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em colaboração com outras unidades da Embrapa e com Universidades do Brasil e estrangeiras. Na área de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em colaboração estreita com a equipe de

Melhoramento de forrageiras da Embrapa Gado de Corte, buscamos o conhecimento e controle dos mecanismos celulares e moleculares desses modos de reprodução (Carneiro et al., 2003), baseado principalmente na comparação de plantas (Dusi; Willemse, 1999; Araujo et al., 2000) de braquiária das espécies *Urochloa eminii* (syn. *Brachiaria decumbens*)¹, e *U. brizantha* (syn. *B. brizantha*)¹, as quais apresentam os dois modos de reprodução. Esta parceria vem contribuindo ao avanço do conhecimento e geração de novos cultivares. Este Documento apresenta os principais avanços da pesquisa nas linhas da biologia celular e molecular vegetal na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, as perspectivas de avanços na área e o impacto destes resultados.

Estabelecimento de campos experimentais para estudos biotecnológicos

Na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram estabelecidos canteiros de várias espécies de braquiária, introduzidas a partir de mudas provenientes da Embrapa Gado de Corte. Além de cultivares e acessos de *U. brizantha*, *U. eminii* e *U. dictyoneura* (syn. *B. humidicola*)¹, o campo possui progênie dos cruzamentos intraespecíficos entre um parental apomítico e um de reprodução sexual da mesma espécie de *U. eminii* e de *U. dictyoneura*, além de plantas de *U. brizantha* duplicadas artificialmente (Tabela 1). Nas populações intraespecíficas observou-se segregação do modo reprodutivo, constituindo um importante material para a identificação de fatores que possibilitem a manipulação da apomixia, utilizado em estudos de caracterização morfológica, expressão diferencial de genes relacionados ao processo de apomixia e no desenvolvimento de metodologias e bancos genômicos. Nas plantas duplicadas artificialmente, o modo de reprodução sexual foi mantido, mostrando que a duplicação do número de cromossomos de plantas, por si só, não altera seu modo de reprodução. Além dos canteiros, amostras são mantidas em casa de vegetação.

Tabela 1. Acessos e híbridos de espécies de braquiária e de progênie derivada de polinização aberta de plantas com número de cromossomos duplicado.

Espécie	Acesso										
	Sexual	Apomítico									
<i>Urochloa eminii</i>	D4	D58									
<i>Urochloa dictyoneura</i>	H31	H16									
<i>Urochloa brizantha</i>	B105	B30									
Espécie	Cruzamento	Progênie									
		Sexual					Apomítico				
<i>U. eminii</i>	D24/27 x D62	R14	R24	R33	R68	R91	R23	R41	T25	R86	R134
<i>U. dictyoneura</i>	H31 x H16	PL2	PL64	PL216	PL350	-	PL3	PL88	PL120	-	-
<i>U. brizantha</i>	C14 ⁽¹⁾	31	41	42	43	48	-	-	-	-	-

⁽¹⁾ C14 = B105 com número cromossômico duplicado, progênie de polinização aberta.

¹ A classificação de espécies de braquiária foi revista. Os autores adotaram neste Documento a classificação recomendada no "The World Flora online - WFO" na qual *Brachiaria brizantha* tornou-se sinônimo de *Urochloa brizantha*; *B. decumbens* e *B. ruziziensis* são sinônimos de *Urochloa eminii*; *B. humidicola* é sinônimo de *U. dictyoneura*.

Caracterização de processos associados ao desenvolvimento reprodutivo de braquiária

Para identificar precisamente os pontos-chave de diferenciação da reprodução sexual e apomítica, os processos específicos e diferenciados foram analisados em diversos momentos do desenvolvimento de anteras e ovários de plantas sexuais e apomíticas de espécies de braquiária (Tabela 2). Em duas espécies de braquiária, em plantas apresentando sexualidade ou apomixia, foram caracterizados morfologicamente os estádios de desenvolvimento do óvulo e saco embrionário, desde o início da megasporogênese, megagametogênese e formação da semente. Dados da fisiologia do desenvolvimento reprodutivo como ocorrência de aborto, alterações do metabolismo de carboidratos e outros foram observados. Essa caracterização minuciosa lançou luz sobre o processo sexual e apomítico, servindo de base para os estudos moleculares e para o desenvolvimento de metodologias.

Tabela 2. Caracterização de processos associados ao desenvolvimento reprodutivo de espécies de braquiária.

Processo	Planta	Referência
Diferenciação de saco embrionário	<i>Urochloa</i> spp.	Pozzobon e Araujo (1997, 1998)
Deposição de calose durante a megasporogênese e microsporogênese	<i>Urochloa eminii</i>	Dusi e Willemse (1999)
Metabolismo de carboidratos em óvulos de plantas	<i>U. eminii</i>	Dusi e Willemse (1999)
Atividade e localização das enzimas sacarose sintetase e invertase	<i>U. eminii</i>	Dusi e Willemse (1999)
Desenvolvimento reprodutivo	<i>U. eminii</i>	Dusi e Willemse (1999)
Formação de sementes	<i>Urochloa brizantha</i>	Alves et al. (1999)
Desenvolvimento do microgametófito	<i>U. eminii</i> <i>U. brizantha</i>	Dusi e Willemse (1999), Dusí (2001), Koehler et al. (2020, 2022)
Descrição de meiose em plantas autotetraploides	<i>U. brizantha</i>	Pozzobon et al. (1999)
Desenvolvimento do saco embrionário apospórico do tipo <i>Panicum</i> e meiótico do tipo <i>Polygonum</i>	<i>U. eminii</i> <i>U. brizantha</i>	Dusi e Willemse (1999a, 1999b) e Araujo et al., (2000)
Pseudogamia	<i>U. brizantha</i>	Alves et al. (2001)
Distribuição de mRNA e RNA total em óvulos	<i>U. eminii</i>	Dusi (2001)
Apomixia facultativa em acessos de braquiária	<i>Urochloa</i> spp.	Araujo et al. (2004)
Reprodução de plantas duplicadas artificialmente	<i>U. brizantha</i>	Araujo et al. (2005)
Aborto de sementes	<i>U. brizantha</i>	Araujo et al. (2007)
Alopoliploidia	<i>U. brizantha</i>	Nielen et al. (2010)
Embriogênese somática e organogênese	<i>U. brizantha</i>	Lenis-Manzano et al. (2010), Cabral et al. (2011, 2015)
Desenvolvimento de anteras in vivo e in vitro	<i>U. brizantha</i>	Koehler et al. (2022)

Bancos genômicos de RNA e micro RNA

A pesquisa em apomixia, do tipo apospórica, revela os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação de gametófitos não reduzidos a partir de células somáticas, as células apospóricas iniciais. Uma das hipóteses consideradas é que a iniciação da aposporia decorra de uma desregulação de programas gametofíticos, hipótese discutida por estudos de conteúdo genômico, poliploidia e distribuição geográfica de espécies apomíticas (Carman, 1997). Posteriormente, estudos com marcadores de identidade celular mostraram que a via de reprodução sexual e apomítica compartilham mecanismos moleculares, levantando novamente a possibilidade que a apomixia se inicia pela ativação de um programa gametofítico em células somáticas, ou seja, uma desregulação do programa gametofítico em células esporófitas do óvulo (Tucker et al., 2003).

A expressão de genes em ovários na megasporogênese e megagametogênese de plantas sexuais e apomíticas foi analisada por differential display PCR (DDPCR) (Rodrigues et al., 2003), bancos de cDNA (Silveira et al., 2012) e por RNA-seq (Carneiro et al., 2013) e indicados genes de expressão diferencial em plantas sexuais e apomíticas que vêm sendo avaliados por análises *in planta* sobre a relação com a expressão da apomixia. A montagem de sequências expressas em ovários baseada no genoma de *U. eminii* (syn. *B. ruzizensis*) (Carneiro et al., 2013) levou, por sua vez, à identificação de cerca de 31 mil sequências. Destas, 682 apresentavam expressão diferencial, sendo a maioria (482) de regulação positiva em ovários de plantas apomíticas. Genes de estádios de desenvolvimento específicos, possivelmente associados ao início da apomixia e ao desenvolvimento autônomo do embrião, também foram verificados. Os níveis de expressão relativa dos transcritos foram validados e análise de ontologia gênica foi realizada, apontando os principais processos metabólicos ou de sinalização associados à diferenciação do SE (saco embrionário) em ambos os modos de reprodução (Tabela 3). Estas sequências foram depositadas em bancos de dados da Embrapa e estão sendo analisadas para caracterização molecular deste modo reprodutivo.

A geração de bancos de sequências de mRNAs e RNAs pequenos, a partir de genótipos de *Urochloa* spp., tem possibilitado análise robusta da expressão diferencial. Amostras de mRNA dos genótipos, designados por seus códigos experimentais, de *U. eminii* sexual R14, R24, R68, R91 e apomítico D62, R23, R41, T25, R86 e *U. dictyoneura* sexual PL2, PL64, PL350 e apomítico H16, PL3, PL88 (Tabela 1) foram sequenciadas em plataforma Illumina. Plantas dos genótipos B105 e B30 de *U. brizantha* tiveram seus genomas parcialmente sequenciados em plataforma Illumina, com cobertura aproximada de 80 vezes e 87 vezes, respectivamente.

Tabela 3. Ativos pré-tecnológicos: bancos de sequências de braquiária.

Origem do Banco	Resultado	Referência
DDPCR ⁽¹⁾ de ovários e flores de <i>Urochloa eminii</i> na esporogênese e gametogênese	Uma sequência gênica com expressão em proembriões de plantas APO de 11 sequências	Pozzobon e Araujo (1997, 1998)
DDPCR de ovários de <i>Brachiaria brizantha</i> na esporogênese e gametogênese	Onze sequências gênicas diferencialmente expressas em 65 sequências	Dusi e Willemse (1999)
RNA Seq de ovários de <i>Brachiaria brizantha</i> em dois estádios da esporogênese e dois da gametogênese	682 sequências gênicas diferenciais. Detecção de sequências diferencialmente expressas em momentos chave da reprodução	Dusi e Willemse (1999)
EST de ovários de <i>Brachiaria brizantha</i> APO e SEX em megasporogênese e megagametogênese	1.832 ESTs montados como contigs: 240 clusters e 1.592 singletons. Classificação funcional de 257 contigs. EST detectados preferencialmente em ovários de APO	Dusi e Willemse (1999)
Micro RNAs de acessos parentais e progênes em estágio inicial da microsporogênese	Em análise	Dusi e Willemse (1999)
Banco genômico de <i>Brachiaria brizantha</i> APO e SEX	Montagem parcial dos genomas	Alves et al. (1999)

⁽¹⁾ DDPCR = Droplet Digital Polymerase Chain Reaction; APO = apomítico; SEX = sexual.

Perfil de expressão gênica na reprodução apomítica e sexual

Considerando que a diferenciação na via de reprodução apomítica e sexual ocorre por uma diferenciação na expressão de genes, nossa equipe realiza a comparação do perfil de expressão gênica nos órgãos e tecidos, em momentos precoces e específicos do desenvolvimento de ovários, nos quais as principais diferenciações morfológicas foram detectadas (Tabela 4).

Dentre os genes detectados em estudos de expressão diferencial, alguns se destacam por estarem em vias de sinalização moleculares que controlam outros processos biológicos, como, por exemplo, o fator de transcrição (FT) MADS AGL6 (Guimarães et al., 2013) e o receptor do hormônio giberelina GID-1 (Ferreira et al., 2018). Giberelina atua, entre outros processos, na transição do crescimento vegetativo para o floral (Yu et al., 2012). Giberelinas promovem a degradação de proteínas DELLA, que são inibidoras de fatores de transcrição do tipo *sporocytelless*, SPL. Giberelina também atua para diminuir a concentração do microRNA precursor - miR156, um regulador negativo de SPL. Uma vez liberado de repressores, fatores de transcrição SPL induzem a expressão de outro gene miR, miR172, que degrada APETALA2 (AP2), um repressor de florescimento (Spanudakis; Jackson, 2014). Na ausência de AP2, genes que promovem o florescimento são ativados, particularmente fatores de transcrição MADS que ativam a expressão de FLOWERING TIME (FT) (Yu et al., 2012). Portanto, percebe-se claramente uma interação entre a regulação de fatores de transcrição MADS, o hormônio giberelina e microRNAs que regulam um importante processo biológico na reprodução de plantas (Yu; Wang, 2020). Em braquiária, o FT MADS AGL6 e o receptor de giberelina GID-1 mostraram padrão de localização de expressão idênticos, estando presentes na célula mãe do megásporo (CMM) em plantas sexuais, e na planta apomítica encontram-se na CMM e ao seu redor, no nucelo, onde normalmente surgem as células apospóricas iniciais. É possível que um mecanismo de controle parecido com o descrito para a transição de meristema vegetativo para meristema floral esteja presente no controle do processo de esporogênese em plantas sexuais, restringindo o surgimento de células gametofíticas em plantas sexuais, e que esse mecanismo tenha sido desregulado em plantas apomíticas. A expressão ectópica de *BbrizGID-1* no óvulo de *Arabidopsis* promove o surgimento de células semelhantes à CMM no nucelo (Ferreira et al., 2018), o que corrobora essa hipótese.

Tabela 4. Ativos pré-tecnológicos: genes de braquiária de expressão analisada quanto à associação com a apomixia e o desenvolvimento reprodutivo.

Gene	Similaridade sugerida	Associação com o modo reprodutivo	Referência
<i>BbrizSERK1</i> <i>BbrizSERK2</i> <i>BbrizSERK3</i>	Genes da via de transdução de sinais da embriogênese somática e zigótica	Marcador de embriogênese somática e zigótica	Dusi (2001) e Koehler et al. (2020)
<i>BbrizAQP</i>	Aquaporina	Desenvolvimento do saco embrionário apospórico	Alves et al. (2007)
<i>BbrizMAPK</i>	Proteína quinase mitogenica	Expressão em sinérgides de saco embrionário apospóricos	Alves et al. (2007)

Continua...

Tabela 4. Continuação.

Gene	Similaridade sugerida	Associação com o modo reprodutivo	Referência
<i>BbrizMYO</i>	Miosinas	Expressão em saco embrionário apospórico e, sexual em estágio mais avançado.	Alves et al. (2007)
<i>BbrizUBCE</i> <i>BbrizE1F4A</i> <i>BbrizEF1</i>	UBCE (enzima conjugante de ubiquitina) E1F4A (fator de iniciação eucariótica 4A) EF1 (fator de elongação 1 alfa)	Expressão em tecidos de ovário de <i>Urochloa</i>	Silveira et al. (2009)
<i>BbrizHelic</i>	Helicase – SNF2/SWI2-like protein	Expressão em células nucleares de potencial desenvolvimento de AI	Silveira et al. (2012)
<i>BbrizRan</i>	Proteína RAN da regulação do ciclo celular	Expressão no início de desenvolvimento de ovários apomíticos	Silveira et al. (2012)
<i>BbrizSec13</i>	Proteína tipo Sec 13	Expressão no início de desenvolvimento de ovários apomíticos	Silveira et al. (2012)
<i>BbrizSti1</i>	STI1 (stress induced 1) proteína, envolvida em resposta a estresse.	Células nucleares de potencial desenvolvimento de célula inicial apospórica e célula mãe do megásporo	Silveira et al. (2012)
<i>BbrizRPS15a</i>	Proteínas ribossomais S15	Sinérgides de apomíticos	Lacerda et al. (2012)
<i>BbrizRPS8</i> <i>BbrizRPL41</i>	Proteínas ribossomais S8 e L41	Tecidos mitoticamente ativos, no início do desenvolvimento das anteras, e todo desenvolvimento de ovários	Lacerda et al. (2012)
<i>BbrizAGL6</i>	<i>B. brizantha</i> sex e apo	Formação do saco embrionário	Guimarães et al. (2013)
<i>Bbriz GID1</i>	GID1 é um receptor de giberelina	Células nucleares de potencial desenvolvimento de célula inicial apospórica	Ferreira et al. (2018)
<i>MAP3K-Coding QGJ</i>	The MAP3K-Coding QUI-GON JINN (QGJ)	Reprimido em célula inicial apospórica de braquiária	Mancini et al. (2018)

A desregulação de genes da reprodução sexual em plantas apomíticas também pode ser evidenciada por meio da análise de mutantes de plantas sexuais, contendo os genes em estudo silenciados ou superexpressos, particularmente na planta modelo *Arabidopsis*, em que alterações no desenvolvimento morfológico associadas à apomixia aparecem (Ferreira et al., 2018). Esse é o caso do sur-

gimento de células germinativas que se diferenciam a partir de células somáticas do nucelo, como quando há mutações em determinados genes da via de produção de pequenos RNAs que controlam a expressão de retrotransposons em *Arabidopsis* (Olmedo-Monfil et al., 2010). Essa característica, que é uma perda do mecanismo de restrição para evitar que várias células adquiram o potencial germinativo, ocorre na apomixia gametofítica denominada aposporia, presente em *Urochloa*. Um grupo de mutantes também mostrou a capacidade de produzir endosperma sem a fertilização da célula central, característica de plantas apomíticas autônomas, como *Hieracium* (Chaudhury et al., 2001; Koltunow; Grossniklaus, 2003). Nos mutantes de *Arabidopsis*, denominados *fis* (*Fertilization Independent Seed*) as mutações foram mapeadas em grupos de genes pertencentes a um complexo repressor transcricional denominado Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), também conservado em animais (Kinoshita et al., 2001). Esse complexo é composto por várias proteínas cuja função é silenciar a expressão de genes alvo através de modificações epigenéticas, especificamente pela atividade histona metiltransferase (H3K27). Devido a seu fenótipo similar ao desenvolvimento autônomo do endosperma em *Hieracium*, estudos funcionais para diminuir a expressão de um dos membros do complexo, *FIE* (*Fertilization Independent Endosperm*), mostrou que o gene é essencial para formação da semente na planta apomítica e sexual, porém não forma interações com outros membros do complexo como descrito em *Arabidopsis* (Rodrigues et al., 2008). Nossa equipe isolou o homólogo de *FIE*, *BbrizFIE*, e pode-se verificar que não há diferença transcricional entre a planta apomítica e sexual durante o desenvolvimento do ovário, no entanto, observou-se expressão diferencial durante as fases iniciais do desenvolvimento da antera, no meristema e flores (Rodrigues et al., 2010). Similarmente, dois homólogos desse complexo também foram analisados quanto à expressão, *BbrizSWN* e *BbrizCLF*, tendo o mesmo padrão de expressão de *BbrizFIE* (Rodrigues et al., 2011). Estudos de localização de expressão utilizando *whole mount* mostraram que em ambos os casos, a expressão inicia cedo na diferenciação da flor, no meristema e nos primórdios do estame e do pistilo. Não está claro qual a função desse complexo em tecidos masculinos no início do desenvolvimento em plantas apomíticas. Como a apomixia pode ser transmitida via pólen para plantas sexuais e é um caráter dominante, é possível que modificações epigenéticas sejam necessárias no gametófito masculino para que isto ocorra.

Há evidências de que alguns microRNAs podem estar envolvidos nos diferentes tipos de reprodução. Nossos estudos têm como perspectiva a definição da correlação quando comparados genótipos apomíticos e sexuais em diferentes espécies: *U. brizantha*, *U. eminii* e *U. dictyoneura*.

Metodologias desenvolvidas

Visando apoiar análises de expressão gênica e melhoramento genético, foram desenvolvidos ativos pré-tecnológicos nas principais linhas de pesquisa da equipe (Tabela 5). Uma vez que a diferença de níveis de ploidia, entre as plantas de reprodução sexual diploides e apomíticas tetraploides (Penteado et al., 2000), torna-se um fator limitante a cruzamentos intraespecíficos, foram desenvolvidas metodologias para duplicar a ploidia de plantas sexuais e, deste modo, viabilizar os cruzamentos. Algumas delas mostraram-se apropriadas à utilização direta no programa de melhoramento genético dessas forrageiras. Como exemplo citamos a metodologia de duplicação do número de cromossomos *in vitro*. A geração de plantas duplicadas evidenciou a manutenção do modo de reprodução por sexualidade nas plantas que tiveram o número de cromossomos duplicado artificialmente (Pinheiro et al., 2000; Araujo et al., 2005; Cabral et al., 2016). Plantas sexuais duplicadas de *Urochloa* spp. estão sendo empregadas na produção de linhagens intraespecíficas na Embrapa Gado de Corte.

Tabela 5. Ativos pré-tecnológicos: metodologias desenvolvidas.

Metodologia	Planta	Referência
Introdução in vitro, micropropagação e conservação	<i>Brachiaria</i> spp. e <i>Urochloa</i> spp.	Pinheiro et al. (2000) e Cabral et al. (2003, 2011)
Seleção de promotores exógenos para transformação genética.	<i>B. brizantha</i>	Silveira et al. (2003)
Duplicação de número de cromossomos e evidências da manutenção do modo de reprodução.	<i>Brachiaria</i> spp. e <i>Urochloa</i> spp.	Pinheiro et al. (2000), Cabral et al. (2003) e Araujo et al. (2005)
Prospecção de cepas de <i>Agrobacterium</i> spp. para a transformação genética de braquiária	<i>Brachiaria</i> spp. e <i>Urochloa</i> spp.	Cabral et al. (2005)
Embriogênese somática repetitiva	<i>B. brizantha</i>	Cabral et al. (2006, 2011, 2016)
Microdissecção de óvulos por captura a laser	<i>B. brizantha</i>	Silveira et al. (2007)
Indução de embriogênese somática em folhas	<i>B. brizantha</i>	Cabral et al. (2008)
Fertilização in vitro	<i>Brachiaria</i> spp. e <i>Urochloa</i> spp.	Dusi et al. (2010)
Embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras	<i>B. brizantha</i>	Lenis-Manzano et al. (2010)
Organogênese a partir de sementes maduras	<i>B. brizantha</i>	Cabral et al. (2011)
Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos	<i>B. brizantha</i>	Cabral et al. (2015)
Regeneração de plantas a partir de suspensões celulares	<i>B. brizantha</i>	Cabral et al. (2015)
Transferabilidade de microssatélites	<i>Brachiaria</i> spp. e <i>Urochloa</i> spp.	Buso et al. (2016)
Transformação genética de calos embriogênicos e células em suspensão por biobalística	<i>B. brizantha</i>	Cabral et al. (2018)
Análise da expressão de genes em células em suspensão por hibridização in situ por whole mount	<i>B. brizantha</i>	Koehler et al. (2021)
Seleção rápida dos diferentes estádios de desenvolvimento da antera baseada em identificadores morfológicos comuns a várias espécies	<i>B. brizantha</i>	Koehler et al. (2022)

Há alguns anos busca-se estabelecer metodologia de regeneração eficiente pela cultura de tecidos de braquiária. Verificamos que como outras monocotiledôneas são em geral consideradas mais recalcitrantes à transformação genética do que as dicotiledôneas. Isso se deve em parte à resposta dessas plantas à cultura in vitro. Assim, foram desenvolvidas metodologias para incrementar a eficiência da cultura de tecidos, do modo de introdução do gene exógeno e da detecção de genes associados à reprodução (Cabral et al., 2011, 2015, 2016, 2018). A indução de calos, usando sementes maduras de braquiária como explante inicial, foi relatada em quatro espécies (Tohme et al., 1996). Em seguida, foram determinados os parâmetros físicos do bombardeamento de embriões maduros de braquiária, para a transformação via embriogênese somática (Lenis-Manzano, 1998).

Em *U. eminii*, embriões somáticos e múltipla brotação foram obtidos de meristemas apicais (Ishigaki et al., 2009), calos embriogênicos mostraram-se mais aptos à transformação genética do que meristemas apicais (Ishigaki et al., 2012).

Com o objetivo de estabelecer protocolo de cultura de tecidos capaz de gerar alta taxa de divisão celular nos explantes iniciais da cultura, o que facilitará a integração do DNA exógeno, estabelecemos regeneração de espécies de braquiária, via organogênese e via embriogênese (Cabral et al., 2011). Células de tecidos embriogênicos apresentam rápida proliferação, assim como células em suspensão, as quais além dessa característica desejável, possibilitam sincronização do estágio de desenvolvimento, ambos os sistemas foram desenvolvidos. São eles, a embriogênese somática obtida a partir de calos embriogênicos de *B. brizantha* e regeneração eficiente de plantas (Cabral et al., 2015) e o sistema de indução, manutenção e regeneração de células embriogênicas em suspensão (Cabral et al., 2016). Foram desenvolvidas metodologias para transformação genética via biobalística (Cabral et al., 2018). O desenvolvimento de metodologia para transformar cultivares apomíticos viabiliza a introdução de características agronômicas importantes em plantas de braquiária e abre a possibilidade de estudar in vivo a função de genes relacionados à reprodução. Mais recentemente, com fins biotecnológicos, foi introduzido na pesquisa em cultura de tecidos o híbrido Ipyporã. Este híbrido, BRS RB331, entre *B. brizantha* e *U. eminii* (*syn. B. ruziziensis*) foi produzido pela Embrapa Gado de Corte em parceria com a UNIPASTO (Valle et al., 2017). Para tal, as técnicas estabelecidas anteriormente estão servindo como ponto de partida e os resultados da cultura in vitro são bastante promissores.

Considerações finais

A biotecnologia e a engenharia genética são empregadas para incrementar as práticas de melhoramento genético, de modo geral, para que se tornem mais rápidas, específicas e eficientes. A busca pela obtenção de genes de controle da apomixia ou sexualidade ocorre em diferentes espécies. Braquiárias naturalmente apomíticas apresentam importantes características agronômicas, o que gera extensas áreas de pastagens de clones idênticos. Este é um elemento de preocupação que leva a busca de conhecimento das bases moleculares de seu modo de reprodução. Neste sentido, é realizada a pesquisa em braquiária na Embrapa, em colaboração com diferentes unidades de pesquisa, além de universidades e outras instituições no Brasil e outros países. Os resultados do trabalho da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, aqui apresentados, buscando caracterizar os principais processos associados ao desenvolvimento reprodutivo de braquiária, geraram produtos pré-tecnológicos, como metodologias, bancos genéticos e genes associados. As plantas poliplóides, obtidas pela duplicação em laboratório do número de cromossomos, por exemplo, permitiram a produção de populações de híbridos intraespecíficos. A caracterização de marcadores moleculares beneficia diretamente o melhoramento genético. Metodologias de regeneração, crescimento de plantas in vitro e de desenvolvimento de plantas transgênicas estão sendo aplicadas em cultivares de braquiária, utilizando genes de interesse agrônomico, como aqueles para produção de novas cultivares adaptadas a estresses e com maior produção de biomassa. Identificamos genes de expressão em ovários associados aos pontos de controle estratégicos do desenvolvimento da reprodução sexual e assexual por apomixia. Foram construídos bancos de DNA e cDNA de plantas sexuais e apomíticas que vêm sendo usados na identificação de novas sequências associadas a estes modos de reprodução, micro RNAs e marcadores moleculares. Os genes validados, associados ao modo de reprodução apomítico ou sexual, formam um valioso conjunto de dados que contribuirá à identificação do controle do modo reprodutivo dessas plantas. A possibilidade de ativar a apomixia, pela expressão de genes determinantes da apomixia, pode tornar uma planta sexual

em apomítica, beneficiando a agricultura de diferentes espécies. Por outro lado, a possibilidade de desativar a apomixia em plantas sexuais, permitirá incluí-las em esquemas de hibridação convencionais para obtenção de híbridos superiores, aumentando a variabilidade genética da espécie. Além disso, a apomixia poderá ser introduzida por transformação genética ou edição gênica.

Referências

- ALBERTINI, E.; BARCACCIA, G.; CARMAN, J. G.; PUPILLI, F. Did apomixis evolve from sex or was it the other way around? **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 11, p. 2951-2964, 2019.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAUJO, A. C. G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 207-212, 2001.
- ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. In situ localization of three cDNA sequences associated with the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. **Protoplasma**, v. 231, n. 3-4, p. 161-171, 2007.
- ALVES, E. R.; PENTEADO, M. I. O.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAUJO, A. C. G. Seed ploidy analysis of apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (A. Rich) Stapf. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 486, 1999.
- ARAUJO, A. C. G.; FALCÃO, R.; CARNEIRO, V. T. C. Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v. 20, p. 109-121, 2007.
- ARAUJO, A. C. G.; FALCÃO, R.; SIMÕES, K. C. R.; CARNEIRO, V. T. C. **Identificação de acessos de *Brachiaria* com interesse ao estudo da apomixia facultativa**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 26 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 71).
- ARAUJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Révue de cytologie et de biologie végétales**, v. XXIII, n. 1-2, p. 13-28, 2000.
- ARAUJO, A. C. G.; NÓBREGA, J. M.; POZZOBON, M. T. CARNEIRO, V. T. C. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, v. 144, p.39-50, 2005.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, (R), p. 61-76, 2008.
- BUSO, G. S. C.; CARVALHO, N.; LEITE, P. H. S.; CANELA, F. M.; SOUZA, J.; DUSI, D. M. A.; TOGAWA, R. C.; AMARAL, Z. P. S.; CHIARI, L.; CARNEIRO, V. T. C. **Transferibilidade de primers microssatélites desenhados de seqüências expressas de *Brachiaria brizantha* para *B. decumbens* e *B. humidicola***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 202).
- CABRAL, G.; CARNEIRO, V.; LACERDA, A.; DO VALLE, C.; MARTINELLI, A.; DUSI, D. M. A. Somatic embryogenesis and organogenesis in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 2, p. 271-282, 2011.
- CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A.; MARTINELLI, A. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Brachiaria brizantha*. In: GERMANÀ, M. A.; LAMBARDI, M. **In vitro embryogenesis in higher plants**. New York: Humana, 2016. p. 395-402. (Methods in molecular biology, 1359).
- CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; GOMES, A. C. M. M.; LACERDA, A. L. M.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. Genetic transformation of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu by biolistics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.2, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170842>.
- CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; ROSSI, M. L.; SILVA, J.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. Plant regeneration from embryogenic callus and cell suspensions of *Brachiaria brizantha*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: plant**, v. 51, p. 360-377, 2015. DOI 10.1007/s11627-015-9690-0.
- CABRAL, G. B.; CARNEIRO, V. T. C.; SANTANA, C. G.; LEITE, J. A.; PIRES, M. V. V.; DUSI, D. M. A. **Prospecção de cepas de *Agrobacterium* spp. para a transformação genética de braquiária**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 17 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Boletim de Pesquisa, 115).
- CABRAL, G. B.; LACERDA, A. L. M.; PIRES, M. V. V.; RODRIGUES, J. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Expressão do gene *gus* em diferentes explantes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras, MG. **Estratégias para novos rumos: anais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. p. 431.

- CABRAL, G. B.; OLIVEIRA, L.; CARNEIRO, V. T. C. Effect of osmotic pressure in *Brachiaria brizantha* cv. Marandu genetic transformation by biolistic. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO SEXUAL EM PLANTAS, 20., 2008, Brasília, DF. [Anais...]. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 240 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 259). p. 195-196.
- CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L. M. CARNEIRO, V. T. C. Introdução, micropropagação e manutenção in vitro de plantas de *Brachiaria* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras, MG. **Estratégias para novos rumos: anais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. p. 267.
- CABRAL, G. B.; SANTANA, C. G.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A.; MATSUMOTO, K. **Ocorrência de albinismo em embriogênese somática repetitiva em *Brachiaria brizantha***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 7p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa, 155).
- CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 61, n. 1, p. 51-94, 1997.
- CARNEIRO, V. T. C.; ARAÚJO, A. C. G.; DUSI, D. M. A.; CABRAL, G. B.; RODRIGUES, J. C. M.; ALVES, E. R.; SILVEIRA, E. D.; LACERDA, A. L. M.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R. **Contribuição da biotecnologia ao domínio da apomixia de *Brachiaria* sp.** Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 95).
- CARNEIRO, V. T. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; COSTA, M. C.; TOGAWA, R. C.; RODRIGUES, J. C. M.; LACERDA, A. L. M.; DUSI, D. M. A.; ALVES-FERREIRA, M.; IRSIGLER, A. T.; PAPPAS, G. Deep sequencing-based transcriptome of *Brachiaria brizantha* as a tool for development studies of sexual and apomictic plants. In: INTERNATIONAL PLANT & ANIMAL GENOME, 21., 2013, San Diego. [Abstracts]... [S.l.:s. n.], 2013. Não paginado.
- CHAUDHURY, A. M.; KOLTUNOW, A.; PAYNE, T.; LUO, M.; TUCKER, M. R.; DENNIS, E. S. PEACOCK, W. J. Control of early seed development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 677-99, 2001.
- CONNER, J. A.; MOOKKAN, M.; HUO, H.; CHAE, K. OZIAS-AKINS, P. A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 36, p. 11205-11210, 2015.
- DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**. 2001. Tese (Doutorado) - Wageningen Universiteit, Holanda.
- DUSI, D. M. A.; ALVES, E.; WILLEMSE, M.; FALCÃO, R.; DO VALLE; C. CARNEIRO, V. T. C. Toward in vitro fertilization in *Brachiaria* spp. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, p. 187-197, 2010.
- DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Activity and localisation of sucrose synthase and invertase in ovules of sexual and apomictic *Brachiaria decumbens*. **Protoplasma**, v. 208, p. 173-185, 1999.
- DUSI, D. M. A. WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensia: series botanica**, v. 41, p. 151-162, 1999.
- FEI, X.; SHI, J.; LIU, Y.; NIU, J. WEI, A. The steps from sexual reproduction to apomixis. **Planta**, v. 249, n. 6, p. 1715-1730, 2019.
- FERREIRA, L. G.; DUSI, D. M. A.; IRSIGLER, A. S. T.; GOMES, A. C. M. M.; MENDES, M. A.; COLOMBO, L. CARNEIRO, V. T. C. **GID1 expression is associated with ovule development of sexual and apomictic plants. Plant Cell Reports**, v. 37, n. 2, p. 293-306, 2018.
- FAZ, S.; WANG, X.; YOUNAS, A.; ALHARTHI, B.; RIAZ, A. ALI, H. Apomixis and strategies to induce apomixis to preserve hybrid vigor for multiple generations. **GM Crops & Food**, v. 12, n. 1, p. 57-70. 2021.
- GUIMARÃES, L. A.; DUSI, D. M. A.; MASIERO, S.; RESENTINI, F.; GOMES, A. C. M. M.; SILVEIRA, E. D.; FLORENTINO, L. H.; RODRIGUES, J. C. M.; COLOMBO, L. CARNEIRO, V. T. C. **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.
- HAND, M. L.; KOLTUNOW, A. M. G. The genetic control of apomixis: asexual seed formation. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 441-450, 2014.
- HOJSGAARD, D. Apomixis technology: Separating the wheat from the chaff. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 411, 2020. DOI: 10.3390/genes11040411.
- ISHIGAKI, G.; GONDO, T.; SUENAGA, K. AKASHI, R. Fertile transgenic *Brachiaria ruziziensis* (ruzigrass) plants by particle bombardment of tetraploidized callus. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 5, p. 546-549, 2012.

JANK, L.; BARRIOS, S. C.; VALLE, C. B. d.; SIMEÃO, R. M.; ALVES, G. F. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132-1137, 2014.

KINOSHITA, T.; HARADA, J. J.; GOLDBERG, R. B. FISCHER, R. L. Polycomb repression lowering during early plant development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 14156-14161, 2001.

KOEHLER, A. D.; IRSIGLER, A. S. T.; CARNEIRO, V. T. C.; CABRAL, G. B.; RODRIGUES, J. C. M.; GOMES, A. C. M. M.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. C.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. SERK genes identification and expression analysis during somatic embryogenesis and sporogenesis of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*). **Planta**, v. 252, n. 3, p. 39, 2020.

KOEHLER, A. D.; CABRAL, G. B.; GOMES, A. C. M. M.; CARNEIRO, V. T. C.; MARTINELLI, A. P.; DUSI, D. M. A. **Metodologia para identificação rápida de regiões embriogênicas em culturas de células em suspensão de *Brachiaria brizantha* (A.Rich.) Stapf (sin. *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A.Rich.) R.Webster)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 375).

KOEHLER, A. D.; ROSSI, M. L.; CARNEIRO, V. T. C.; MARTINELLI, A. P. DUSI, D. M. A. Anther development in *Brachiaria brizantha* (syn. *Urochloa brizantha*) and perspective of microspore in vitro culture. **Protoplasma**, 2022. DOI <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01802-w>.

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

LACERDA, A. L. M.; DUSI, D. M. A.; ALVES, E. R.; RODRIGUES, J. C. M.; GOMES, A. C. M. M.; CARNEIRO, V. T. C. Expression analyzes of *Brachiaria brizantha* genes encoding ribosomal proteins BbrizRPS8, BbrizRPS15a and BbrizRPL41 during development of ovaries and anthers. **Protoplasma**, v. 250, n. 12, p. 505-514, 2012.

LENIS-MANZANO, S. J.; ARAUJO, A. C. G.; VALLE, C. B. D.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 5, p. 435-441, 2010.

LENIS-MANZANO, S. J. **Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria* sp, por bombardeamento de partículas**. 1998. 131 p. Tese (Mestrado em Biologia Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

MANCINI, M.; PERMINGEAT, H.; COLONO, C.; SIENA, L.; PUPILLI, F.; AZZARO, C.; DUSI, D. M. A.; CARNEIRO, V. T. C.; PODIO, M.; SEIJO, J. G.; GONZÁLEZ, A. M.; FELITTI, S. A.; ORTIZ, J. P.; LEBLANC, O. PESSINO, S. C. The MAP3K-Coding QUI-GON JINN (QGJ) gene is essential to the formation of unreduced embryo sacs in *Paspalum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1547, 2018.

MANCINI, M.; WOITOVICH, N.; PERMINGEAT, H. R.; PODIO, M.; SIENA, L. A.; ORTIZ, J. P. A.; PESSINO, S. C. FELITTI, S. A. Development of a modified transformation platform for apomixis candidate genes research in *Paspalum notatum* (bahiagrass). **In Vitro Cellular & Developmental Biology: plant**, v. 50, p. 412-424, 2014.

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

NIELEN, S.; ALMEIDA, L. M.; CARNEIRO, V. T. C. ARAUJO, A. C. G. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 45-51, 2010.

OLMEDO-MONFIL, V.; DURAN-FIGUEROA, N.; ARTEAGA-VAZQUEZ, M.; DEMESA-AREVALO, E.; AUTRAN, D.; GRIMANELLI, D.; SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSEN, R. A. VIELLE-CALZADA, J.-P. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 628-632, 2010.

PENTEADO, M. I. de O.; SANTOS, A. C. M. dos; RODRIGUES, I. F.; VALLE, C. B. do; SEIXAS, M. A. C.; ESTEVES, A. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2000. 32 p. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de pesquisa, 11).

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

PIRES, M. V. V.; CABRAL, G. B.; LACERDA, A. L.; RODRIGUES, J. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Expressão do gene *gus* em diferentes explantes de *Brachiaria brizantha* cv. marandu. ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 8., 2003, Brasília, DF. **Anais: resumos dos trabalhos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. p. 41.

POZZOBON, M. T.; ARAÚJO, A. C. G. Analysis of *Brachiaria* and *Paspalum* (Gramineae) embryo sacs using Herr's clearing modified technique and interference microscopy. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, p. Supl. J7, 1997.

- POZZOBON, M. T. ARAÚJO, A. C. G. **Técnica de clareamento modificada na análise de sacos embrionários em *Brachiaria e Paspalum* (Gramineae) através da microscopia interferencial.** Brasília. DF. Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia, 1998. 15p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 3).
- POZZOBON, M. T.; PEREIRA, R. F. A.; PINHEIRO, A. A.; ARAUJO, A. C. G. CARNEIRO, V. T. C. Meiotic behavior in induced autotetraploids plants of *Brachiaria brizantha*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 107, 1999.
- RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D. CARNEIRO, V. T. C. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, v. 53, 2003, p. 745-757, 2003.
- RODRIGUES, J. C. M.; COELHO, C. M. S. S.; CARNEIRO, V. T. C. Characterization of two PRC2-related SET-domain genes of apomictic *Brachiaria brizantha* plants. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 3., 2011, Ilhéus. **Resumos ...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011.
- RODRIGUES, J. C. M.; LUO, M.; BERGER, F.; KOLTUNOW, A. M. G. Polycomb group gene function in sexual and asexual seed development in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, n. 2, p.123-133, 2010.
- RODRIGUES, J. C. M.; TUCKER, M. R.; JOHNSON, S. D.; HRMOVA, M.; KOLTUNOW, A. M. G. Sexual and apomictic seed formation in *Hieracium* requires the plant polycomb-group gene fertilization independent endosperm. **Plant Cell**, v. 20, n. 9, p. 2372-2386, 2008.
- RONCERET, A.; VIELLE-CALZADA, J. Meiosis, unreduced gametes, and parthenogenesis: implications for engineering clonal seed formation in crops. **Plant Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 91-102, 2015.
- SAILER, C.; SCHMID, B.; GROSSNIKLAUS, U.; Apomixis allows the transgenerational fixation of phenotypes in hybrid plants., **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. 331-7, 2016.
- SILVEIRA, E.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARAES, L.; DA SILVA, F.; CARNEIRO, V. T.C. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 84, 2009.
- SILVEIRA, E. D.; DUSI, D. M. A.; CARNEIRO, V. T. C. **Preparação de ovários de *Brachiaria* para LCM (Laser Capture Microdissection)** - microdissecção por captura a laser. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 10 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 196).
- SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; DUSI, D. M.A; DA SILVA, F. R.; MARTINS, N. F.; COSTA, M. M.C; ALVES-FERREIRA, M. CARNEIRO, V. T. C. Expressed sequence-tag analysis of ovaries of *Brachiaria brizantha* reveals genes associated with the early steps of embryo sac differentiation of apomictic plants. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 2, p. 403-416, 2012.
- SILVEIRA, E. D.; RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; LEITE, J. A.; COSTA, S. S.; CARNEIRO, V. T. C. Evaluation of exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2003.
- SPANUDAKIS, E. JACKSON, S. The role of microRNAs in the control of flowering time. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 2, p. 365-80, 2014.
- TOHME, J.; PALACIOS, N.; LENIS, S. ROCA, W. Applications of biotechnology to *Urochloa*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. D. ***Brachiaria*: biology, agronomy and improvement.** Cali, Colombia: Ciat, 1996. v. 1. p.196-204.
- TUCKER, M. R.; ARAUJO, A. C. G.; PAECH, N.; HECHT, V.; SCHMIDT, E. D. L.; ROSSEL, J.-B.; DE VRIES, S. C.; KOLTUNOW, A. M. G. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1524-1537, 2003.
- VALLE, C. B. D.; BONATO, A. L. V.; PAGLIARINI, M. S.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. (ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. v. 1. p.123.
- VALLE, C. B. D.; EUCLIDES, V. B. P.; MONTAGNER, D. B.; VALÉRIO, J. R.; MENDES-BONATO, A. B.; VERZIGNASSI, J. R.; TORRES, F. Z. V.; MACEDO, M. C. M.; FERNANDES, C. D.; BARRIOS, S. C. L.; FILHO, M. B. D.; MACHADO, L. A. Z.; ZIMMER, A. H. **BRS Ipyorã (“belo começo” em guarani): híbrido de *Brachiaria* da Embrapa.** Embrapa Gado de Corte, 2017. 18 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado técnico, 137).
- VALLE, C. B. D.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres Viçosa**, v. 56, p. 460-472, 2009.
- VALLE, C. B. D.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L. VALLE, C. B. D. ***Brachiaria*: biology, agronomy and improvement.** Cali, Colombia: Ciat, 1996. v. 1. p.288

VANDIJK, P.J.; RIGOLA, D. SCHAUER, S. E. Plant Breeding: Surprisingly, Less Sex Is Better. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R122-R124, 2016.

VIGNA, B. B. Z.; SANTOS, J. C. S.; JUNGSMANN, L.; VALLE, C. B. do; MOLLINARI, M. PASTINA, M. M. Evidence of Allopolyploidy in *Urochloa humidicola* based on cytological analysis and genetic linkage mapping. **PLoS ONE** v. 11, n. 4, p. e0153764, 2016.

YU, S.; GALVÃO, V. C.; ZHANG, Y.-C.; HORRER, D.; ZHANG, T.; HAO, Y.-H.; FENG, Y.-Q.; WANG, S. S., M. WANG, J.-W. Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. **The Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3320-3332, 2012.

YU, S.; WANG, J.-W. The crosstalk between microRNAs and gibberellin signaling in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 61, n. 11, p. 1880-1890, 2020.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA



CGPE 018161