

Brasília, DF / Fevereiro, 2026

Análise e expressão diferencial de *BbrizLOG* em tecidos reprodutivos de plantas sexuais e apomíticas de *Urochloa brizantha*

Luciana Gomes Ferreira⁽¹⁻²⁾, Diva Maria de Alencar Dusj⁽³⁾, Ana Cristina Meneses Mendes Gomes⁽⁴⁾, Julio Carlyle Macedo Rodrigues⁽⁴⁾, André Southernman Teixeira Irsigler⁽⁵⁾ e Vera Tavares de Campos Carneiro⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Estudante, Universidade de Brasília, DF. ⁽²⁾ Professora, Escola Estadual Antonio Oliveira da Silva, SEDUC-GO, Goiânia, GO. ⁽³⁾ Pesquisadora aposentada, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. ⁽⁴⁾ Analistas, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. ⁽⁵⁾ Pesquisadores, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Resumo - Espécies do gênero *Urochloa*, conhecidas como braquiárias, reproduzem-se predominantemente de modo assexual por apomixia. *U. brizantha* (syn. *Brachiaria brizantha*), gramínea amplamente cultivada em pastagens no Brasil, apresenta tanto reprodução sexual quanto apomítica. A manipulação de genes relacionados à apomixia desperta grande interesse biotecnológico. No contexto da regulação hormonal, citocininas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do óvulo e na regulação da reprodução. Este estudo apresenta o padrão de expressão do gene *BbrizLOG* durante o desenvolvimento do óvulo em plantas sexuais e apomíticas de *U. brizantha*, buscando associações com seu modo reprodutivo. Foram analisadas a estrutura do gene e sua expressão em diferentes estádios do desenvolvimento reprodutivo. Os resultados são discutidos em relação às possíveis implicações para a determinação do modo de reprodução em *U. brizantha*.

Termos para indexação: apomixia, aposporia, braquiária, saco, embrionário, óvulo.

Analysis and differential expression of *BbrizLOG* in reproductive tissues of sexual and apomictic plants of *Urochloa brizantha*

Abstract - Forage plants of the genus *Urochloa*, commonly referred to as brachiaria, mainly reproduce asexually through apomixis. *U. brizantha* (syn. *Brachiaria brizantha*) is a grass species widely cultivated in pastures in Brazil, which exhibits both sexual and apomictic reproduction. The manipulation of genes involved in the reproductive strategies of these plants has attracted growing scientific interest, owing to its substantial potential for biotechnological applications. Phytohormones, such as cytokinins, play important roles in ovule development and the regulation of plant reproduction. The aim of this study was to analyse the expression pattern of the *BbrizLOG* gene during ovule development and investigate its potential association with the differential development of ovules in sexual and apomictic *U. brizantha*

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica,
PqEB Av. W5 Norte (final)
www.embrapa.br/
recursos-geneticos-e-
biotecnologia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

João Henrique Moreira Viana

Secretária-executiva

Ana Flavia do Nascimento Dias

Membros

Andrielle Camara Amaral Lopes,

Bruno Machado Teles Walter,

Carolina Vianna Morgante,

Débora Pires Paula, Edson

Junqueira Leite, Marcos

Aparecido Gimenes, Solange

Carvalho Barrios Roveri Jose e

Sueli Correa Marques de Mello.

Normalização bibliográfica

Rosamare Rocha Galvão

(CRB-1/2122)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Adilson Werneck

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

plants. We present analyses of the gene structure and its expression at different stages of reproductive development and discuss the potential implications of these findings for its mode of reproduction.

Index terms: apomixis, apospory, brachiaria, embryo sac, ovule.

Introdução

Plantas de braquiária têm grande importância para a produção pecuária brasileira, ocupando vasta área de pastagens cultivadas (Carneiro; Dusi, 2004; Araújo et al., 2008; Jank et al., 2014; Ferreira et al., 2021), dos quais 86 milhões de hectares com espécies de *Urochloa* (Hungria et al., 2021). Muitas dessas forrageiras, da família Poaceae, apresentam reprodução sexual e assexual (Miles; Valle, 1996; Valle et al., 2004), o que lhes confere grande interesse ao estudo dos mecanismos moleculares associados a esses modos reprodutivos.

Algumas espécies do gênero *Brachiaria* passaram a ser consideradas como pertencentes ao gênero *Urochloa* (Shirasuna, 2010), como *U. brizantha* (syn. *Brachiaria brizantha*) que apresenta genótipos com reprodução sexual ou, assexual por apomixia (Miles; Valle, 1996; Valle et al., 2004). A apomixia é considerada um modo natural de clonagem de plantas, uma vez que as sementes resultantes desenvolvem plantas idênticas à planta-mãe (Carneiro; Dusi, 2004).

A análise de genes que regulam a expressão de características específicas de plantas apomíticas pode fornecer informações sobre os genes responsáveis por direcionar a reprodução das plantas para modos sexuais ou apomíticos, entre eles os genes envolvidos na síntese de fitohormônios. Nos óvulos de *U. brizantha* e *U. decumbens* de reprodução apomítica, a formação de sacos embrionários (SE) não reduzidos ocorre diretamente a partir de células somáticas dentro do óvulo, dispensando a necessidade de meiose ou fertilização (Dusi; Willemse, 1999; Araújo et al., 2000). Visando identificar genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento do ovário em plantas de *U. brizantha* (Carneiro et al. 2013); construímos bibliotecas de RNA-Seq de ovários dessas plantas, que nos permitem realizar estudos comparativos entre os dois modos de reprodução, sexual e apomítico (Dusi et al., 2023; Ferreira et al., 2023; Rodrigues et al., 2003). Entre os genes associados ao desenvolvimento diferencial dos ovários de plantas sexuais e apomíticas identificamos o gene que denominamos *BbrizLOG*, devido à similaridade de sua sequência de nucleotídeos com aquela do gene LONELY GUY (LOG) do arroz, que codifica uma citocinina ribosídico 5'-monofosfato fosforibohidrolase. Essa enzima

converte nucleotídeos de citocinina inativos diretamente em bases livres ativas (Kurakawa et al., 2007). Mutações no gene LOG, em arroz, afetam diretamente o desenvolvimento dos óvulos. Os mutantes *log* de arroz, por exemplo, apresentaram anormalidades, como a redução no número de órgãos florais, com flores contendo apenas um estame, enquanto pistilos e óvulos não se formaram. Como resultado, os mutantes *log* tornaram as plantas de arroz completamente estéreis (Kurakawa et al., 2007). Em *Arabidopsis*, análises morfológicas e metabólicas demonstraram que uma família de genes, composta por nove genes semelhantes ao LOG, denominados *AtLOGs*, está envolvida na ativação direta da citocinina, sendo essencial para o crescimento e desenvolvimento normais da planta (Kuroha et al., 2009). Além disso, análises de expressão de *AtLOGs::GUS* revelaram expressão diferencial dos *AtLOGs* em vários tecidos durante o desenvolvimento da planta.

Material vegetal

Acessos de *U. brizantha* foram gentilmente cedidos pela Embrapa Gado de Corte e mantidos em canteiros da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Pistilos em diferentes fases de desenvolvimento foram coletados de acessos sexuais e apomíticos de *U. brizantha* cultivados no campo, sendo eles: -BRA 002747 (diplóide sexual, $2n=2x=18$) e -BRA 00591 (tetraplóide apomítico, $2n=4x=36$). A categorização dos estádios de desenvolvimento coletados foi realizada conforme descrito anteriormente (Araújo et al., 2000; Rodrigues et al., 2003), e apresentada a seguir

Estádios I e II: Pistilos com óvulos em megasporogênese. No estágio I, os pistilos têm estigmas curtos e óvulos com células nucelares e célula mãe do megásporo (MMC). No estágio II, os pistilos têm estigmas alongados e óvulos com megásporos. Em plantas apomíticas, há também as células iniciais apospóricas (AI).

Estádios III e IV: Pistilos com óvulos em megagametogênese. No estágio III, os pistilos apresentam estigmas brancos. Nos óvulos de plantas sexuais, observa-se um saco embrionário (SE) meiótico imaturo. Nos óvulos de plantas apomíticas, são observados múltiplos SE imaturos apospóricos. No estágio IV, os pistilos são longos e têm estigmas vermelhos. Os óvulos em plantas apomíticas apresentam SE maduros do tipo Panicum, enquanto nas plantas sexuais apresentam SE maduros do tipo Polygonum.

Análise de sequências de cDNA

A sequência completa de LOG de *U. brizantha* foi analisada utilizando BLAST contra o banco de dados NCBI para encontrar similaridades entre diferentes espécies. O ClustalW2 (Chenna et al., 2003) foi utilizado para alinhar sequências parciais de nucleotídeos e aminoácidos. O e-value e a identidade acima de 94% foram usados para definir as sequências com maior similaridade. O banco de dados TAIR (The Arabidopsis Information Resource) foi também utilizado para análises comparativas entre as sequências dos genes em estudo e a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. As sequências genômicas dos genótipos sexuais e apomíticos foram identificadas nas bibliotecas genômicas e analisadas com o Webcutter 2.0. As sequências genômicas dos genótipos sexuais e apomíticos identificadas nas bibliotecas e analisadas com o Webcutter 2.0.

Análise de hibridização Southern

DNA genômico (30 µg) extraído de folhas jovens de *U. brizantha* apomítica e sexual foi digerido com *EcoRI*, *HindIII* e *XbaI* a uma concentração de 2,5 U/µg de DNA. Um fragmento de PCR (pb) de BbrizLog foi amplificado usando os primers 5' ATGACGATGAGGCAGTCGAG 3' e 3' GCCCATCTCCCAGTTGAGCGTG 5'. A sonda foi marcada com 32P- α CTP, e os ensaios de hibridização e detecção radioativa foram realizados seguindo o protocolo descrito em Sambrook e Russell (2001). Os sinais foram visualizados usando o Phosphorimager™ FUJIFILM FLA-3000 SERIES e analisados com os programas Image Reader FLA-3000 V1.8 e Multi Gauge V3.0 para exibição das imagens.

Isolamento de RNA e análise de RT-qPCR de ovários de *U. brizantha*

O RNA total foi extraído de ovários de plantas sexuais e apomíticas de *U. brizantha*. As amostras consistiram em um pool de 250 ovários coletados de diferentes plantas em cada um dos quatro estádios, conforme descrito anteriormente (Araújo et al., 2000; Rodrigues et al., 2003). O procedimento de extração envolveu o uso de TRIZOL® (Invitrogen), seguindo método já estabelecido no laboratório (Rodrigues et al., 2003; Ferreira et al., 2018). Para a análise $\Delta\Delta$ Ct, foram realizadas três réplicas técnicas para cada uma das três réplicas biológicas. A reação de transcrição reversa utilizou SuperScript III (Invitrogen) e 2 µg de RNA, de acordo com o protocolo do fabricante. Os experimentos de RT-qPCR foram realizados com o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os pares de oligonucleotídeos para amplificação de BbrizLog foram projetados com o programa Primer 3.0 (Rozen;

Skaletsky, 2000) e tinham as seguintes sequências: *Forward* 5' GCCGTGGAGGAAGGGTTCATCA e *Reverse* 3' GCCCATCTCCCAGTTGAGCGTG 5'. Para BbrizUBCE, que serviu como gene de referência na análise $\Delta\Delta$ Ct (Silveira et al., 2009), os pares de oligonucleotídeos utilizados foram: *Forward*: 5' GGCTTGGCTCTCCATCTGCT 3'; *Reverse*: 3' CGGGCTGTCGTCTCATACTT 5'.

Análise por hibridização in situ

Secções semifinas (3,5 µm) de ovários de plantas sexuais e apomíticas de *U. brizantha* foram submetidas a análises por hibridização in situ. Para este propósito, um fragmento de PCR de 606 pb do gene BbrizLOG foi clonado no sistema de vetores pGEM-T Easy Vector System I (Invitrogen) e utilizado como molde para gerar sondas senso e antisenso com as polimerases SP6 e T7, respectivamente. As sondas, 5' ATGACGATGAGGCAGTCGAG 3' e 3' GCCCATCTCCCAGTTGAGCGTG 5' foram marcadas com o kit de marcação de RNA com digoxigenina (DIG RNA labeling-Roche). A preparação das amostras e os procedimentos de hibridização in situ seguiram protocolos previamente descritos (Rodrigues et al., 2003; Silveira et al., 2012; Dusi, 2015; Ferreira et al., 2018;). As lâminas com as secções de ovários hibridizados foram examinadas com um microscópio óptico Zeiss Axiophot e as imagens capturadas com o software Axiovision 4.7 (Zeiss).

Resultados e Discussão

Análise da sequência de BbrizLOG

A sequência de aminoácidos do gene BbrizLOG, presente em bibliotecas genômicas de *U. brizantha* sexual e apomítica, está apresentada na Figura 1. BbrizLOG identificado nas plantas sexuais revelou sequência nucleotídica idêntica em plantas sexuais e apomíticas nas regiões que codificam 206 aminoácidos, com uma única divergência de 465 pares de bases nas regiões de íntrons.

O alinhamento em bases de dados (Figura 1) mostrou alta similaridade com sequências de outras espécies da família Poaceae e regiões conservadas: *Setaria italica* (100%), *Dichanthelium oligosanthos* (99%), *Panicum hallii* (99%), *Sorghum bicolor* (99%), *Oryza sativa* Japonica Group (97%), *Zea mays* (98%), *Oryza brachyantha* (95%) e *Brachypodium distachyon* (94%). A busca por domínios conservados no NCBI *Conserved Domain Search* revelou a presença do motivo PGGXGTXXE, característico da superfamília das fosforibohidrolases, à qual pertencem os genes LOG em diversas plantas.

Estudos iniciais sugeriram que o motivo PGGXG-TXXE poderia estar relacionado à funcionalidade de enzimas da família das lisinas descarboxilases (LDC). Porém, análises estruturais e funcionais mais recentes demonstraram que essa associação era fruto de anotações equivocadas em bactérias, uma vez que proteínas antes classificadas como LDC apresentaram,

na realidade, atividade de fosforibohidrolase, e não de descarboxilase de lisina (Naseem et al., 2018). Assim, o motivo PGGXG-TXXE não indica atividade de descarboxilase e, até o momento, não há evidências de que genes LOG de plantas contendo esse motivo apresentem qualquer função relacionada à descarboxilação.

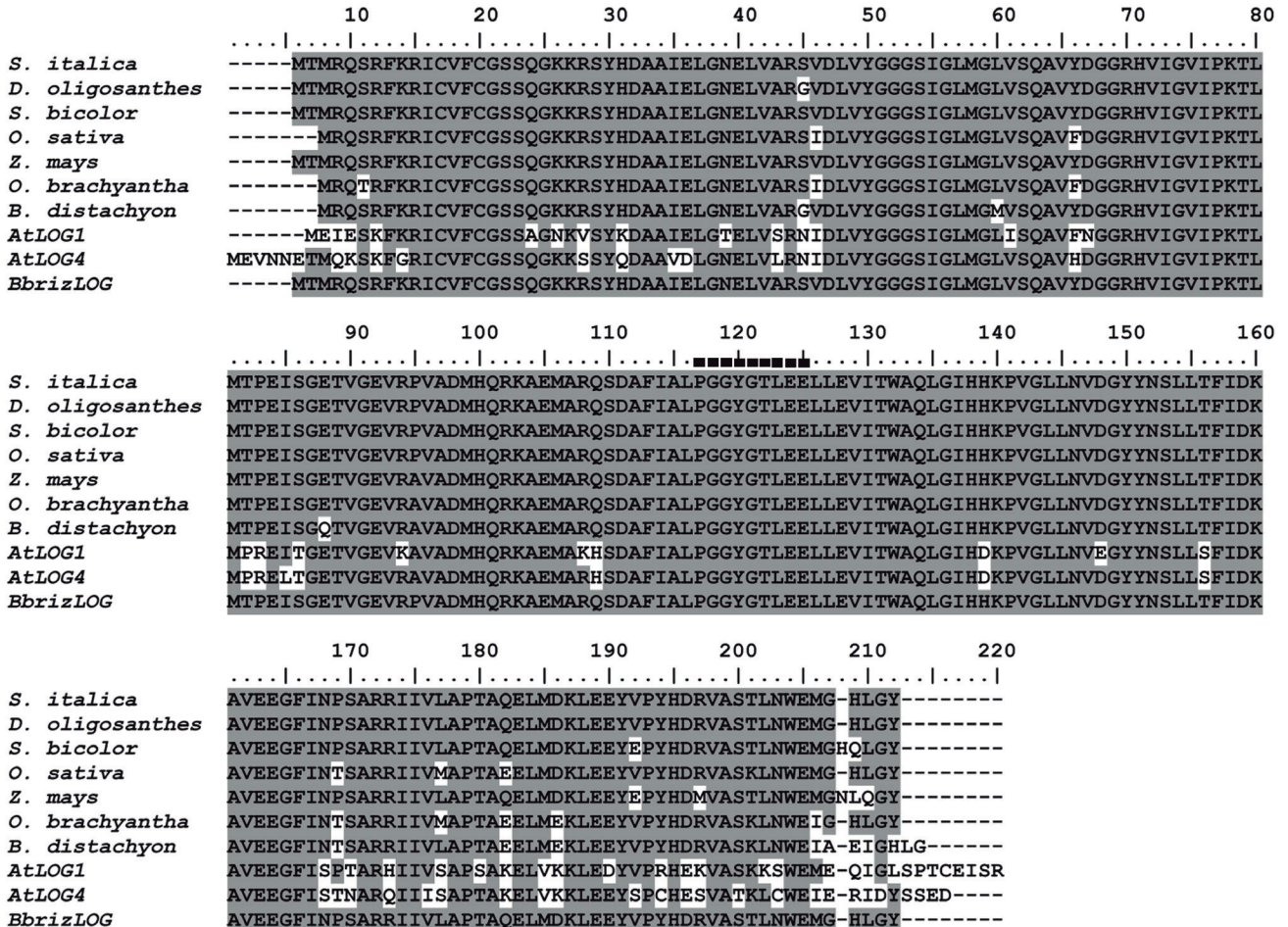


Figura 1: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos do gene *BbrizLOG*, com sequências homólogas de monocotiledôneas depositadas nos bancos NCBI e TAIR. Estão incluídas sequências de *Setaria italica* (XP_004982851.1), *Dichanthelium oligosanthes* (OEL17164.1), *Panicum hallii* (PAN46850.1), *Sorghum bicolor* (XP_002467072.1), *Oryza sativa*, grupo japonica (XP_015613334.1), *Zea mays* (NP_001169307.1), *Oryza brachyantha* (XP_006661863.1), *Brachypodium distachyon* (XP_003574067), além de *AtLOG4* (AT3G53450) e *AtLOG1*. Resíduos conservados, aparecem em cinza, e o motivo PGGXG-TXXE está indicado por quadrados. O alinhamento foi gerado em ClustalW.

As sequências de aminoácidos deduzidas de *BbrizLOG* apresentaram 80% de similaridade com *AtLOG4* e *AtLOG3*, e 79% com *AtLOG1* de *Arabidopsis*, em concordância com estudos anteriores que demonstram a conservação estrutural e funcional da família LOG (Kurakawa et al., 2007).

As sequências de aminoácidos derivadas dos genes *BbrizLOG* identificadas em plantas apomíticas e sexuais de *U. brizantha* é apresentada na Figura 2.

Observa-se na figura o alinhamento das sequências utilizando o programa Clustal W2 (Chenna et al. 2003).

Não há diferenças entre elas. Isso indica que as sequências de aminoácidos de *BbrizLOG* são altamente semelhantes e conservadas entre as plantas apomíticas e sexuais de *U. brizantha*.

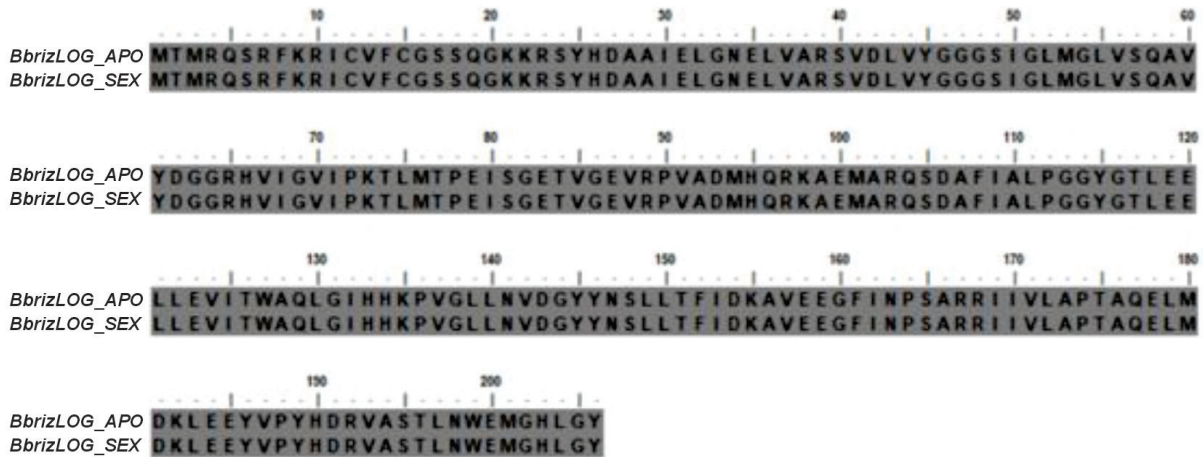


Figura 2: Sequências previstas de 206 aminoácidos do gene *BbrizLOG* obtidas de plantas apomíticas (*BbrizLOG_APO*) e sexuais (*BbrizLOG_SEX*) sexuais de *Urochloa brizantha*. O alinhamento realizado no Clustal W2 mostrou ausência de diferenças entre as sequências.

A hibridização genômica confirmou que o gene *BbrizLOG* está presente em cópia única em *U. brizantha*, tanto em genótipos sexuais quanto em apomíticos (Figura 3). A digestão do DNA com as

enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *XbaI* resultou em uma única banda. Foi confirmada a ausência de locais de restrição na sequência da sonda utilizada, como mostrado na Figura 3.

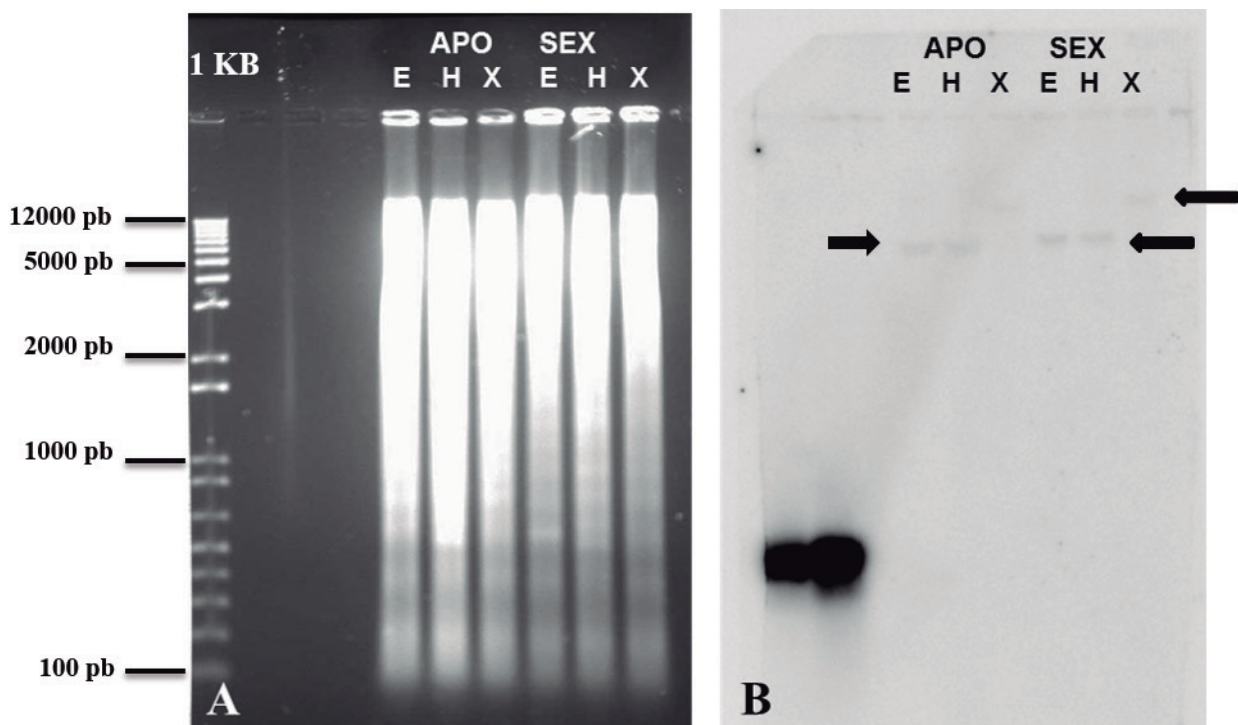


Figura 3: Análise de DNA genômico de plantas apomíticas (APO) e sexuais (SEX) de *Urochloa brizantha* digerido com *EcoRI* (E), *HindIII* (H) e *XbaI* (X). Gel de agarose 0,8% (E) e *Southern blot* com sonda de *BbrizLOG* marcada com ^{32}P (F). Imagens obtidas em Phosphorimager FUJIFILM FLA-3000 Series. C = controle.

Expressão diferencial de *BbrizLOG* em ovários de *U. brizantha* apomítica e sexual. A análise de RT-qPCR corroborou os resultados anteriores obtidos por RNA-Seq (CARNEIRO et al. 2013), mostrando maior

expressão de *BbrizLOG* nos ovários apomíticos, especialmente durante a megasporogênese e megagametogênese (Figura 4).

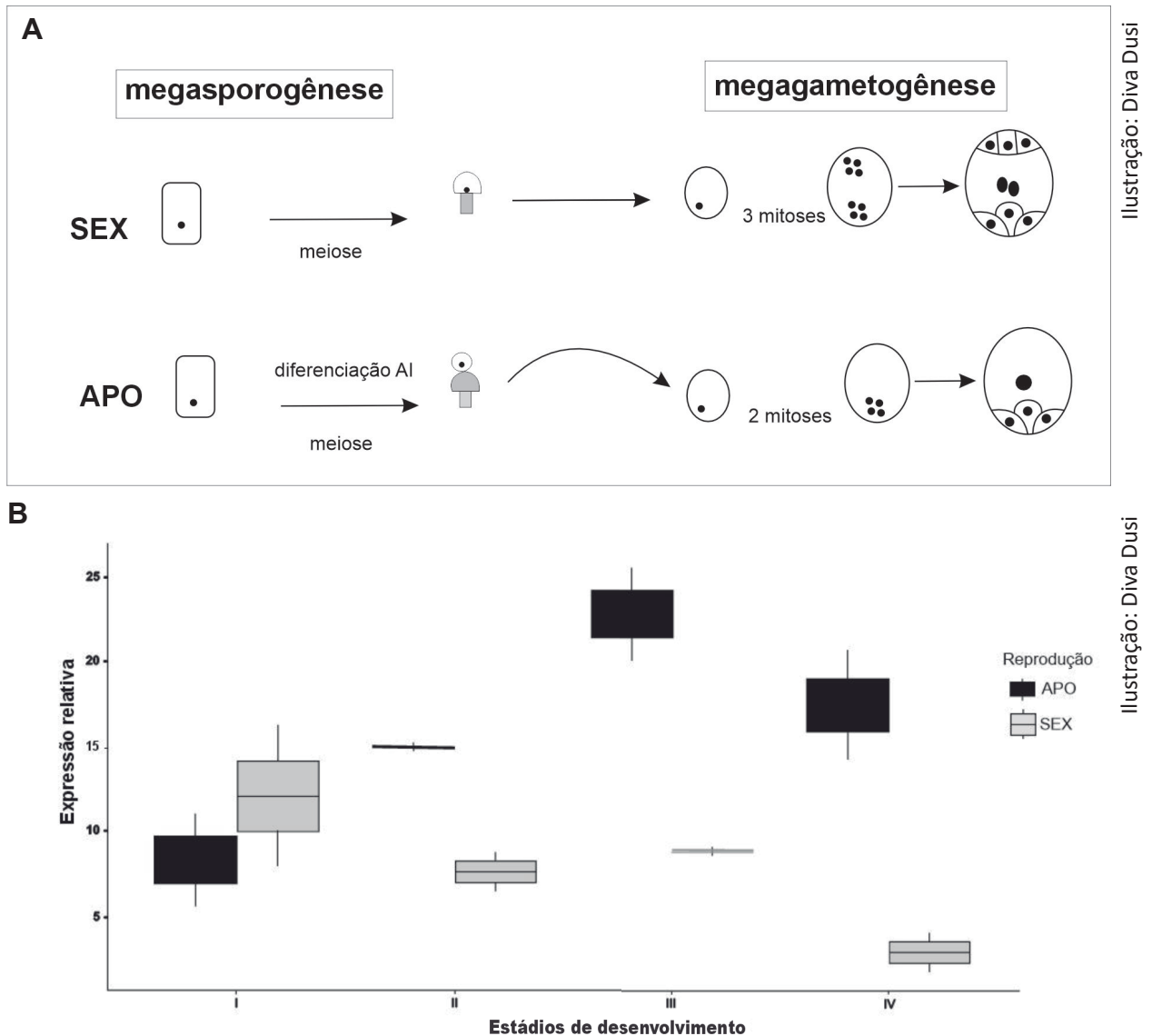
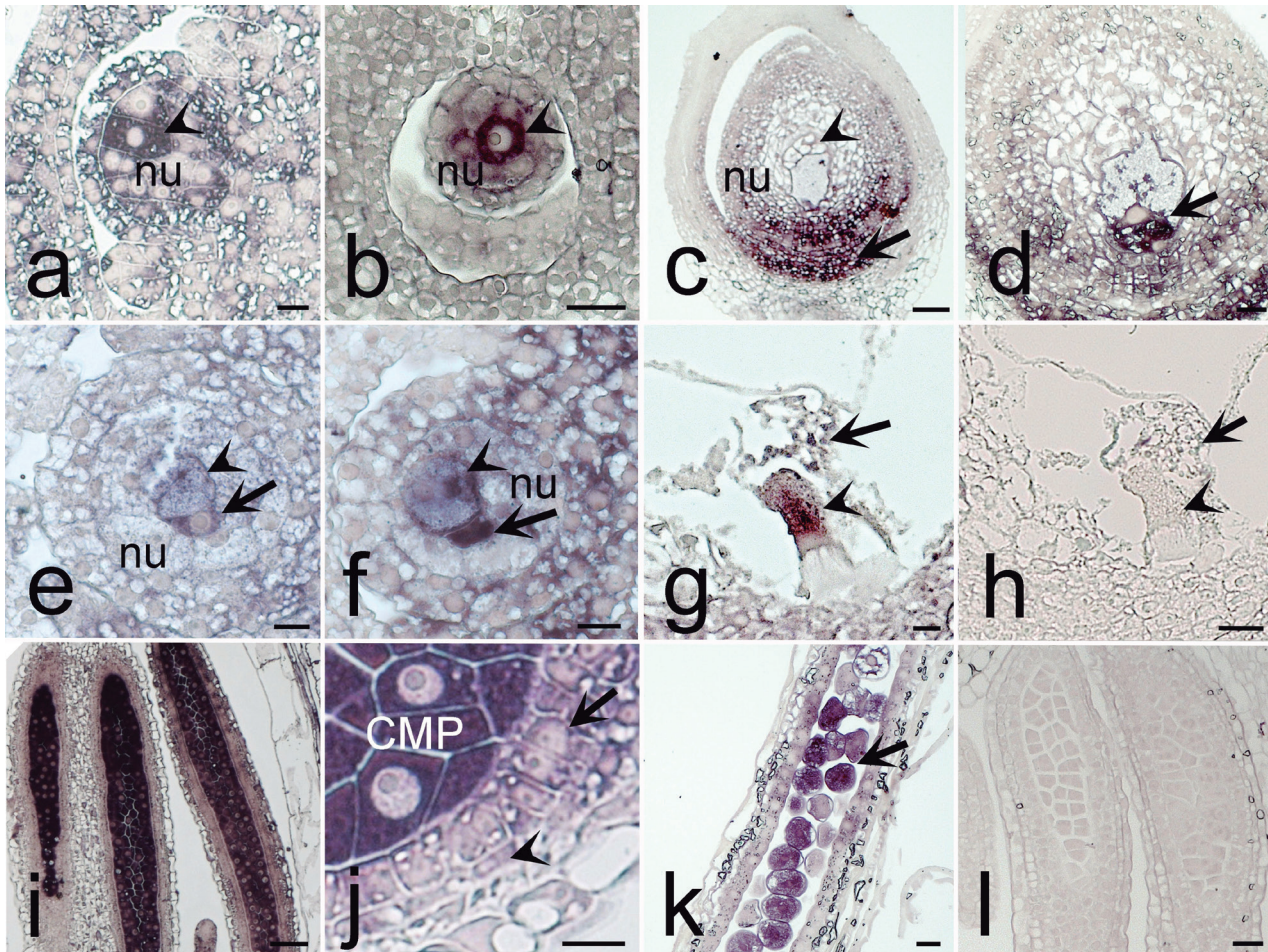


Figura 4: (a) Esquema do desenvolvimento de ovários de plantas sexuais (SEX) e apomíticas (APO) de *Urochloa brizantha* nos estádios I–IV. No estágio I, ambos apresentam células nucleares e a célula-mãe do megasporo (CMM). No estágio II, observam-se megásporos e, apenas em APO, células iniciais apospóricas (AI). No estágio III, plantas sexuais exibem saco embrionário meiótico imaturo, enquanto plantas apomíticas apresentam múltiplos sacos apospóricos imaturos. No estágio IV, plantas APO formam sacos embrionários maduros do tipo *Panicum*, e SEX formam sacos do tipo *Polygonum*. (b) Expressão relativa de *BbrizLOG* por RT-qPCR em ovários nos estádios I–IV de plantas apomíticas (preto) e sexuais (cinza). Boxplots mostram média, mediana e quartis. Barras representam desvio padrão de três réplicas biológicas. Diferenças significativas foram detectadas entre modos reprodutivos e entre estádios ($p < 0,05$).

Na figura 4 observa-se que o nível mais alto de expressão foi atingido no estágio III do desenvolvimento de ovários de plantas apomíticas, o qual demarca o início da megagametogênese. A análise de ANODEV demonstrou diferenças significativas na expressão de *BbrizLOG* entre plantas sexuais (cinza) e apomíticas (preto) de *U. brizantha* ($F=8,7269$, $p=0,01046$), mas não foram observadas diferenças significativas entre os estádios de desenvolvimento dentro de cada modo de reprodução ($F=0,5228$, $p=0,6747$).

Localização da expressão de *BbrizLOG* em ovários e anteras de *U. brizantha*

A análise de hibridização in situ (Figura 5) revelou expressão de *BbrizLOG* na célula mãe do megásporo (MMC) durante a meiose em plantas sexuais, e sinais localizados no núcleo e no aparato da oosfera durante a megagametogênese. Nos apomíticos, *BbrizLOG* foi expresso na MMC e em uma célula IA próxima. Tanto as anteras de plantas sexuais quanto de plantas apomíticas mostraram sinais fortes de hibridização nas células mães do pólen (PMC) e nos micrósporos em desenvolvimento.



Fotos: Luciana Ferreira - (a,b,e,k,f,i) - | Fotos: Diva Dusi - (c,d,g,h,j,l)

Figura 5: Expressão de *BbrizLOG* por hibridização in situ em ovários e anteras de *Urochloa brizantha* sexual (a–d, i, j) e apomítica (e–h, k, l).

(a, b) Ovário em megasporogênese mostrando a célula-mãe do megásporo (CMM) com forte sinal de hibridização; células nucleares apresentam sinal fraco.

(c, d) Ovário em megagametogênese com alto sinal no lado micropilar da nucela e no aparato da oosfera; células antípodas não exibem sinal.

(e, f) Ovário apomítico em megasporogênese mostrando sinal moderado na CMM e forte em célula inicial apospórica (AI); demais células nucleares sem sinal.

(g) Saco embrionário apomítico com sinal fraco em sinérgida e ausência de sinal na oosfera.

(h) Controle com sonda senso sem sinal.

(i, j) Antera sexual com forte sinal na célula-mãe do grão de pólen (CMP) e sinal fraco no tapete e endotécio.

(k) Antera apomítica com sinal intenso em micrósporos uninucleados.

(l) Controle com sonda senso sem sinal.

A análise da expressão do gene *BbrizLOG* em óvulos e anteras de *U. brizantha*, tanto em plantas sexuais quanto apomíticas, revelou aspectos interessantes. As células que iniciam o desenvolvimento do gametófito — seja a MMC (célula-mãe do megásporo) nos óvulos ou a PMC (célula-mãe do micrósporo) nas anteras — apresentam níveis elevados de expressão de *BbrizLOG* em comparação às células nucleares ao redor. Como ambas são destinadas a entrar em meiose, os dados sugerem um possível envolvimento desse gene em eventos que precedem ou regulam o início da meiose.

Um ponto particularmente relevante é que, nas plantas apomíticas, a MMC não é a célula com maior

expressão de *BbrizLOG*, e essa célula tampouco completa a meiose. Em vez disso, a expressão mais intensa ocorre na AI (célula inicial apospórica), uma célula diplóide do nucelo que entra diretamente em mitose para formar um megagametófito não reduzido — processo característico da apomixia. Portanto, enquanto na planta sexual a expressão de LOG é restrita à MMC, na planta apomítica parece haver uma desregulação da localização do transcrito de LOG, expandindo-se para as células nucleares ao redor da MMC, que dão origem ao SE apomítico. Nas anteras, a expressão de *BbrizLOG* também é elevada no micrósporo, uma célula haplóide que passa por mitoses para originar os gametas masculinos.

Conclusões

1- O gene *BbrizLOG* de *U. brizantha* apomítica é homólogo ao gene LONELY GUY de arroz;

2- A sequência em aminoácidos deduzida de *BbrizLOG* tem alta similaridade em plantas sexuais e apomíticas de *U. brizantha*;

3 - Foram detectadas sequências semelhantes a *BbrizLOG* em várias outras espécies da família Poaceae

4 - *BbrizLOG* é expresso durante o desenvolvimento do óvulo de *U. brizantha*.

5 - A expressão de *BbrizLog* revela-se diferencial em óvulos de plantas sexuais e apomíticas – quantitativa e qualitativamente;

6 - *BbrizLOG* se expressa nas células que darão origem ao SE de plantas sexuais e apomíticas de *U. brizantha*, as células mãe do megásporo e as células iniciais apospóricas respectivamente.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Embrapa, CNPq e CAPES-UnB. Agradecem também à UnB pela bolsa de tese a LGF.

Referências

ARAÚJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Cytologia et Biologia Vegetal**, v. 23, n. 1-2, p. 13-28, 2000.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, supl. 1, p. 61-76, 2008.

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

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Descrição dos tipos de apomixia. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. (Org.). **Clonagem de plantas por sementes: estra-**

tégias de estudo da apomixia. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 15-28.

CARNEIRO, V. T. C.; SILVA-JUNIOR, O. B.; GUIMARÃES, L. A.; DUSI, D. M. A.; COSTA, M. C.; TOGAWA, R. C.; RODRIGUES, J. C. M.; LACERDA, A. L. M.; 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: PLANT & ANIMAL GENOME CONFERENCE, 21., 2013, San Diego. **Anais...** San Diego: International Plant & Animal Genome Conference, 2013. Disponível em: <http://www.intlpag.org>. Acesso em: 03 de dezembro de 2025.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J. HIGGINS, D. G.; THOPSON, J. D. Multiple sequence alignment with the 102 Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3497-3500, 2003.

DUSI, D. M. A.; ALVES, E. R.; CABRAL, G. B.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D. J.; SILVEIRA, E. D.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARÃES, L. A.; GOMES, A.; RODRIGUES, J. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. An exonuclease V homologue is expressed predominantly during early megasporogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Planta**, v. 258, n. 1, 5, 2023.

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.

DUSI, D. M. de A. Hibridização in situ para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2.ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 304-327.

FERREIRA, L. G.; DUSI, D. M. A.; IRSIGLER, A. S. T.; GOMES, A. C. 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.

FERREIRA, L. G.; DUSI, D. M. de A.; IRSIGLER, A. S. T.; GOMES, A. C. M. M.; FLORENTINO, L. H.; MENDES, M. A.; COLOMBO, L.; CARNEIRO, V. T. de C. Identification of IPT9 in *Brachiaria brizantha* (syn. *Urochloa brizantha*) and expression analyses during ovule development in sexual and apomictic plants. **Molecular Biology Reports**, v. 50, p. 4887-4897, 2023.

FERREIRA, R. C. U.; MORAES, A. C. L.; CHIARI,

- L.; SIMEÃO, R. M.; VIGNA, B. B. Z.; SOUZA, A. P. An overview of the genetics and genomics of the *Urochloa* species most commonly used in pastures. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.
- HUNGRIA, M.; RONDINA, A. B. L.; NUNES, A. L. P.; ARAUJO, R. S.; NOGUEIRA, M. A. Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. **Plant and Soil**, v. 463, p. 171-186, 2021.
- JANK, L.; BARRIOS, S. C.; VALLE, C. B.; 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.
- KURAKAWA, T.; UEDA, N.; MAEKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; KOJIMA, M.; NAGATO, Y.; SAKAKIBARA, H.; KYOZUKA, J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. **Nature**, v. 445, n. 7128, p. 652-655, 2007.
- KUROHA, T.; TOKUNAGA, H.; KOJIMA, M.; UEDA, N.; ISHIDA, T.; NAGAWA, S.; FUKUDA, H.; SUGIMOTO, K.; SAKAKIBARA, H. Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, n. 10, p. 3152-3169, 2009.
- MILES, J. W.; VALLE, C. B. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Org.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali, Colômbia: CIAT, 1996. p. 288-308.
- NASEEM, M.; BENCUROVA, E.; DANDEKAR, T. The cytokinin-activating LOG-family proteins are not lysine decarboxylases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, p. 201-204, 2018.
- RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D. J.; 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, p. 745-757, 2003.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 365-385, 2000.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3.
- SILVEIRA, E. D.; GUIMARÃES, L. A.; DUSI, D. M. A.; 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.; ALVES-FERREIRA, M.; GUIMARÃES, L.; SILVA, F.; CARNEIRO, V. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR expression studies in the apomictic and sexual grass *Brachiaria brizantha*. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 84, 2009.
- SHIRASUNA, R. T. *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2010.
- VALLE, C. B. de; 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. de C.; DUSI, D. M. de A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 47-66.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA