



ISSN 1676 - 1340

Julho, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 40

Múltiplos sacos embrionários em ovários do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae)

Ana C. G. Araujo
Rosana Falcão

Brasília, DF
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
 Marcos Rodrigues de Faria
 Marta Aguiar Sabo Mendes
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
 José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva
Fotos do trabalho: Ana C. G. Araujo

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

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

Araujo, Ana C. G.

Múltiplos sacos embrionários em ovários do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae) / Ana C. G. Araujo, Rosana Falcão - Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

xx p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 40)

1. Gramínea - Reprodução vegetal. 2. Gramínea - Megasporogênese. 3. Gramínea - Embrião. 4. Gramínea - Gametófito feminino. 5. *Brachiaria brizantha* l. Falcão, Rosana. II. Título. III. Série.

571.82 CDD - Ed. 21

© Embrapa 2003

Sumário

| | |
|---|----|
| Resumo | 5 |
| Introdução | 7 |
| Material e Métodos | 9 |
| Resultados | 9 |
| Discussão e Conclusão | 13 |
| Referências Bibliográficas | 14 |

Múltiplos sacos embrionários em ovários do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae)

Ana C. G. Araujo¹

Rosana Falcão²

Resumo

Durante análises da embriogênese no único acesso diplóide, sexual de *Brachiaria brizantha*, a maioria dos óvulos mostrou apenas um saco embrionário do tipo Polygonum em cada óvulo, sempre associado a seis células antípodas. Entretanto, 14% das amostras continha mais de um saco embrionário do tipo Polygonum em um mesmo óvulo e com o número de antípodas múltiplo de seis. O volume, a forma e a organização dos múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo é similar, indicando que a ocorrência de mais de um saco embrionário no mesmo óvulo não prejudica o crescimento e a maturação destes. Todavia, a presença de embrião só foi observada no saco embrionário ocupando a região mais próxima à micrópila. A ocorrência de múltiplos sacos embrionários no acesso estudado não deve ser considerada um indicativo de apomixia, visto que a apomixia no gênero está descrita em plantas poliplóides contendo sacos embrionários do tipo Panicum. Múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo poderiam advir da diferenciação de mais de uma célula mãe do megásporo, anomalia não observada em estudos anteriormente realizados em *B. brizantha*. Alternativamente, múltiplos sacos embrionários poderiam ser resultantes de uma alteração no programa de morte celular dos megásporos. Novas análises estão sendo realizadas para se determinar a origem morfológica desses múltiplos sacos embrionários.

¹Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Email:guerra@cenargen.embrapa.br

²Bióloga, Bs, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

6

Múltiplos sacos embrionários em ovários do acesso sexual de *Brachiaria brizantha* (Poaceae)

Introdução

A formação do gameta feminino ou oosfera, parte fundamental da reprodução em angiospermas, se dá no megagametófito, também chamado de saco embrionário, que se desenvolve no óvulo, dentro do ovário, na flor. O saco embrionário mais encontrado em angiospermas é o do tipo Polygonum, que apresenta sete células e oito núcleos: a oosfera, duas sinérgides, a célula central binucleada e as células antípodas (Willemse & van Went 1984). O saco embrionário se forma na região central do óvulo composta por um parênquima conhecido como nucelo. Durante a megasporogênese, algumas células do nucelo ($2n$), mais freqüentemente uma única célula em cada óvulo, aumenta seu volume e se diferencia em célula mãe do megásporo (CMM) ou megasporócito. Essa célula sofre meiose e forma uma tétrade de megásporos. Desses, três degeneram-se e o megásporo sobrevivente, normalmente situado mais próximo a região chalazal do ovário, desenvolve-se em um saco embrionário reduzido durante a megagametogênese (Mauseth 1995). Seu núcleo sofre três divisões mitóticas sucessivas, produzindo dois, quatro e oito núcleos haplóides, que migram pelo citoplasma: três núcleos permanecem em cada um dos pólos e dois na região central do saco embrionário. Após o processo de celularização, o saco embrionário apresenta a célula central, que é a mais volumosa e contém os dois núcleos polares, três células antípodas no polo chalazal, duas células sinérgides e a oosfera na região micropilar. Após a dupla fertilização, evento típico em angiospermas, a oosfera e o núcleo polar (resultante da fusão dos dois núcleos polares) formam o embrião e o endosperma, respectivamente, dando origem a semente.

Todavia, nem todas as espécies de angiospermas têm um saco embrionário reduzido ou mesmo um saco embrionário como origem do embrião. Essas plantas apresentam o modo assexual de reprodução e são comumente chamadas de apomíticas e incluem plantas distribuídas em aproximadamente 300 espécies pertencentes a 36 famílias. No modo apomítico de reprodução, o embrião desenvolve-se autonomamente, a partir de células embriogênicas presentes em tecidos do ovário (fora da estrutura de saco embrionário) - embriônia adventícia (Koltunow 1993) ou a partir de uma oosfera em um saco embrionário não reduzido - apomixia gametofítica (Bashaw 1980, Nogler 1984). Esses embriões desenvolvem-se somente a partir de células do tecido feminino, sem a contribuição do gameta paterno formando uma progênie geneticamente similar à planta-mãe, sendo então a apomixia, uma forma natural de clonagem

por meio de sementes (Nogler 1984). Na apomixia gametofítica diplospórica, um saco embrionário é formado a partir da célula generativa, que não passa pela fase reducional da meiose (Asker & Jerling, 1992, Koltunow 1993), enquanto na apomixia apospórica, sacos embrionários desenvolvem-se a partir de algumas células somáticas do nucelo ou tegumento. A diferenciação dessas células em sacos embrionários apospóricos pode ocorrer antes ou durante a degeneração dos megásporos e eventualmente, o megásporo chalazal pode dar origem a um saco embrionário tipo Polygonum - apomixia facultativa (Valle & Savidan, 1996).

O gênero *Brachiaria* (Trin.) Griseb (Poaceae) compreende cerca de 100 espécies de gramíneas, originalmente africanas em sua maioria, das quais algumas são economicamente importantes como pastagens, viabilizando e incrementando a pecuária em diversos países de clima tropical (Renvoize et al. 1996). Uma análise abrangente do modo de reprodução em 14 diferentes espécies de *Brachiaria* realizada numa coleção de 251 acessos reunida pelo CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical (Valle 1990), indicou a ocorrência de apomixia e sexualidade dentro da mesma espécie, para várias espécies de *Brachiaria* (Valle & Savidan 1996). Uma avaliação dos níveis de ploidia por citometria de fluxo (Penteado et al. 2000) confirmou que a maioria dos acessos de *B. brizantha* é tetraplóide ($2n = 4x = 36$), apomíticas (Valle & Savidan 1996) e até o presente momento um único acesso diplóide ($2n = 2x = 18$), sexual está caracterizado (BRA 002747) nesta espécie (Carnahan & Hill 1958, Valle & Glienke 1991).

Além do valor agrônomo das forrageiras *B. brizantha* e *B. decumbens*, essas espécies têm sido utilizadas como modelos para estudos comparativos da biologia do desenvolvimento e reprodução vegetal, com ênfase na apomixia. Na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF, estudos sobre embriogênese em *B. brizantha* têm sido conduzidos visando melhor compreender os mecanismos da reprodução no gênero. Este trabalho relata a ocorrência de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo de plantas do acesso diplóide, sexual de *B. brizantha* durante análises de pistilos maduros.

Material e métodos

Aproximadamente 300 ovários de plantas do acesso diplóide, sexual de *B. brizantha*, BRA 002747 foram isolados de flores durante a antese e a cada dia até três dias após antese (daa). As amostras foram obtidas no campo experimental da Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF, durante os meses de abril e maio de 2002, meses que corresponderam ao período do pico da floração daquele ano. A temperatura média durante esses meses foi de 21°C com máxima de 26 e mínima de 15°C. A precipitação média foi de 124 mm no mês de abril e 41 mm no mês de maio. A duração do dia estimada foi de 12h, com nascer do sol entre 6:00-6:30h e por do sol entre 17:51-18:30h. Essas plantas estão sob regime de irrigação permanente e podas periódicas (dezembro e julho).

Os ovários isolados foram fixados em FAA (formol:ácido acético:etanol, 1:1:18, v/v) por 24 h a 4°C e mantidos em etanol 70% a 4°C. Foram então gradualmente desidratados em uma bateria crescente de etanol (80, 90, 95 e 100%), clarificados lentamente em soluções de xilol:metilsalicato de sódio em proporções crescentes de metilsalicato de sódio até que este estivesse puro. Os ovários clarificados foram montados em lâminas de vidro e observados em microscópio Zeiss Axiophot sob contraste de interferência diferencial (DIC). O número de sacos embrionários bem como a sua estrutura e a presença de embrião e endosperma foi observado em cada óvulo.

Resultados

Os ovários nas flores das plantas do acesso sexual de *B. brizantha* BRA 002747 clarificados e analisados em microscopia DIC confirmaram ser uniovuados. Aproximadamente 86% dos óvulos continham um único saco embrionário do tipo Polygonum (Figs. 1, 4) localizado na região micropilar, típico de plantas com modo sexual de reprodução. A oosfera e duas células sinérgides foram observadas próximas a região da micrópila do ovário. Na célula central, bastante volumosa, foram identificados dois núcleos polares em todos os óvulos coletados em flores em antese, 1 daa e em alguns coletados 2 daa. No restante das amostras de 2 e 3 daa, apenas um núcleo polar foi observado, confirmando que a fusão dos núcleos polares só ocorre entre o segundo e terceiro daa e que este evento é provavelmente dependente da polinização. As seis células antípodas, com contorno irregular e bastante volumosas, estavam

sempre no polo chalazal. A localização, o volume e a forma dessas células, o aspecto denso do citoplasma e do nucleoplasma, a presença de núcleos com pequeno volume e freqüentemente em divisão, são características que facilitam a distinção morfológica das antípodas.

Nos demais ovários analisados (14%), foi observada a presença de mais de um saco embrionário em um mesmo óvulo (tabela 1). Observações anteriores de ovários maduros de outras braquiárias com modo sexual de reprodução não indicaram a presença de mais de um saco embrionário em um mesmo óvulo. A ocorrência de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo é um evento incomum nas plantas com modo sexual de reprodução, já que o megásporo chalazal, único sobrevivente, origina apenas um saco embrionário.



Fig. 1,2,3. Esquemas representativos de ovários de *Brachiaria brizantha*, acesso sexual (BRA 0002747) mostrando óvulos contendo apenas um saco embrionário do tipo Polygonum e as seis antípodas associadas (Fig. 1), dois sacos embrionários do mesmo tipo associado a 12 antípodas (Fig. 2) e óvulo contendo três sacos embrionários com 18 antípodas associadas (Fig. 3).



Fig. 4. Óvulo clarificado de *B. brizantha* coletado de flor em antese e observado sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) mostrando um saco embrionário (SE) onde dois núcleos polares (NP) e cinco das seis antípodas (AP) estão em foco. mi: micrópila. X: 70.

Tabela 1: Número de ovários clarificados e analisados em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) contendo um ou mais sacos embrionários do tipo Polygonum em um mesmo óvulo no acesso diplóide, sexual de *Brachiaria brizantha* (BRA 002747).

| Período da coleta | Nº ovários analisa dos | Nº óvulos contendo 1 saco embrionário | | Nº óvulos contendo 2 sacos embrionários | | Nº óvulos contendo 3 sacos embrionários | | Nº óvulos contendo 4 sacos embrionários | | Ovários não caracterizados |
|-------------------|------------------------|---------------------------------------|------------|---|-----------|---|-----------|---|-----------|----------------------------|
| | | SE | SE* | SE | SE* | SE | SE* | SE | SE* | |
| | | antese | 30 | 26 | 0 | 04 | 0 | 0 | 0 | |
| 1daa | 94 | 79 | 0 | 13 | 0 | 02 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2daa | 67 | 30 | 27 | 0 | 08 | 0 | 0 | 0 | 01 | 01 |
| 3daa | 116 | 21 | 82 | 03 | 06 | 02 | 01 | 0 | 0 | 01 |
| Total | 307 | 156 | 109 | 20 | 14 | 04 | 01 | 0 | 01 | 02 |

SE = saco embrionário do tipo Polygonum.

SE* = saco embrionário do tipo Polygonum contendo embrião e endosperma.

daa = dias após antese.

Os múltiplos sacos embrionários observados em um mesmo óvulo mostraram volume e forma similares entre si, sugerindo que a ocorrência de mais de um saco embrionário no mesmo óvulo não prejudica o crescimento e a maturação destes. A distribuição dos dois (Figs. 2, 5), três (Fig. 3) e quatro sacos embrionários (Fig. 6) nos óvulos mostrou-se bastante regular nos ovários, com um deles sempre ocupando a região da micrópila e os demais distribuídos ao longo do eixo longitudinal do óvulo. A organização dos sacos embrionários observados era similar ao do tipo Polygonum, com todas as células dispostas regularmente dentro de cada saco embrionário com células antípodas associadas ao polo chalazal e morfológicamente similares aquelas descritas em óvulos contendo apenas um único saco embrionário. O número de antípodas observado em óvulos contendo mais de um saco embrionário foi sempre múltiplo de seis: 12 antípodas naqueles contendo dois sacos embrionários, 18 naqueles com três e 24 naquele contendo quatro. Entretanto, essas células apresentaram-se agrupadas ao longo do saco embrionário mais chalazal, não permitindo a determinação de quais antípodas pertenciam a qual saco embrionário.

A presença de embrião e endosperma no saco embrionário situado próximo à micrópila foi observada em alguns dos óvulos coletados 2 e 3 daa, mesmo

naqueles contendo mais do que um saco embrionário. Essa observação confirma que o início da formação do embrião e endosperma ocorre somente a partir de 2 daa, e apenas no saco embrionário micropilar. Todos os sacos embrionários contendo embriões foram caracterizados como do tipo Polygonum, pois foram detectadas células antípodas correspondentes, ainda persistentes no óvulo até pelo menos 3 daa.



Fig. 5. Óvulo coletado um dia após antese (daa) mostrando dois sacos embrionários (SE) onde estão evidentes dois núcleos polares (NP) em cada saco embrionário e apenas seis das 12 antípodas (AP) observadas. mi: micrópila. X: 70



Fig. 6. Óvulo coletado 2 daa mostrando três sacos embrionários (SE) dos 4 observados. Em foco estão 9 das 24 antípodas (AP) presentes. micrópila (mi). X: 70.

Em nenhum dos óvulos analisados foi observado saco embrionário do tipo Panicum e apenas uma pequena parte das amostras (0,5%) não foi caracterizada devido à presença de sacos embrionários abortados ou problemas técnicos com a clarificação do ovário.

Discussão e conclusão

Múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo são comumente descritos em plantas apomíticas apospóricas, como por exemplo no cv. Marandu de *Brachiaria brizantha* (Valle & Savidan, 1996, Araujo et al. 2000, Alves et al. 2001). Por outro lado, a ocorrência de mais de um saco embrionário em plantas que se reproduzem por sexualidade, como observado em alguns dos óvulos das flores do acesso diplóide, sexual de *B. brizantha* BRA002747 é um evento atípico e que não deve ser considerado como um indicativo de apomixia, visto que esse modo de reprodução está presente em braquiárias poliplóides contendo sacos embrionários do tipo Panicum, morfologicamente distintos do tipo Polygonum.

Outras análises feitas em diferentes acessos sexuais e híbridos sexuais de *Brachiaria* confirmam a ocorrência de apenas um saco embrionário do tipo Polygonum em cada óvulo (Gobbe et al. 1982, Ndikumana 1985, Lutts et al. 1982, Dusi & Willense 1999). Poderíamos considerar a possibilidade de que esse acesso de *B. brizantha*, apesar de diplóide, fosse apomítico apospórico contendo sacos embrionários do tipo *Hieracium*, que são morfologicamente similares ao tipo Polygonum. No entanto, estudos morfológicos durante a megasporogênese não indicaram a presença de células iniciais apospóricas bem como não existem relatos da ocorrência desse tipo de saco embrionário no gênero. De fato, o modo de reprodução no acesso BRA 002747 de *B. brizantha* foi caracterizado como sexual por Carnahan & Hill (1958), Valle & Glienke (1991) e Penteado et al. (2000) baseado no seu caráter diplóide e na presença de saco embrionário tipo Polygonum. Outras análises morfológicas durante a megagametogênese e megasporogênese em ovários do acesso sexual de *B. brizantha* clarificados ou através de secções semi-finas confirmaram a origem meiótica do saco embrionário e detalharam a estrutura celular até o estágio anterior a antese (Cunha et al. 1998, Araujo et al. 2000). Consequentemente, a ocorrência de múltiplos sacos embrionários em um mesmo óvulo em alguns ovários de *B. brizantha* sexual, diplóide é resultante de um desvio na formação de sacos embrionários nesse acesso, sem contudo estar diretamente relacionado com a apomixia.

Essa alteração na formação de sacos embrionários nesse acesso poderia ser resultante da diferenciação de mais de uma CMM no nucelo, que por sua vez dariam origem a várias tétrades de megásporos, resultando em mais de um megásporo sobrevivente e consequentemente múltiplos sacos embrionários em

um mesmo óvulo. Entretanto, em *B. brizantha*, apenas uma CMM foi identificada em análises durante a megasporogênese (Araujo et al. 2000).

Alternativamente, a existência de múltiplos de sacos embrionários em um mesmo óvulo poderia ser resultante de uma alteração no programa de morte celular dos megásporos, permitindo eventualmente a sobrevivência de mais de um megásporo. De fato, nossas observações sugerem que mais de um megásporo esteja sobrevivendo no mesmo óvulo, considerando que o número máximo (4) de sacos embrionários observados e a disposição destes dentro do óvulo é similar aquela observada nos megásporos. Análises genéticas e moleculares sugerem que o controle envolvendo os destinos dos megásporos (degeneração e diferenciação) seja uma sinalização localizada (Yang & Sundaresan 2000; Wu & Cheung 2000; Bell, 1996), garantindo que apenas uma única célula seja selecionada para dar origem ao saco embrionário. Entretanto, pouco é sabido sobre o processo de morte celular dos megásporos. A ocorrência de um programa alterado durante o processo de diferenciação de CMM ou de morte celular dos megásporos no acesso sexual de *B. brizantha* deverá ser confirmado através de estudos mais detalhados. Para tal, novas análises serão realizadas para se determinar a frequência desse evento ao longo de diferentes períodos de floração e a origem desses múltiplos sacos embrionários. A confirmação de um desvio no processo de formação dos sacos embrionários em *B. brizantha* poderá contribuir para futuros estudos visando a maior compreensão dos mecanismos de diferenciação e morte celular programada durante a reprodução vegetal.

Referências Bibliográficas

ALVES, E.R., CARNEIRO, V.T.C., ARAUJO, A.C.G. Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae) **Sexual Plant Reproduction**, 14: 207-212, 2001.

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

ARAUJO A.C.G., MUKHAMBETZHANOV S., POZZOBON M.T., SANTANA E.F., CARNEIRO, V.T.C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste**. Tome, XXIII, 13-28, 2000.

BASHAW E.C. Apomixis and its application in crop improvement. In: FERHR, W.R.; HADLEY, H.H. (ed.). **Hybridization of Crop Plants**. Madison: American Society of Agronomy and Crop Science of America, 1980.p.45-63.

BELL P.R. Megaspore abortion: A consequence of selective apoptosis?
International Journal of Plant Sciences, 157:1-7, 1996.

CARNAHAN H.L., HILL H.D. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. **American Journal of Botany**, 54: 253-253, 1958.

CUNHA A.M.C., CARNEIRO V.T.C., ARAUJO A.C.G. Análise do gametófito feminino de *Brachiaria brizantha* através de secções de ovários incluídos em resina Spurr. **Boletim de Pesquisa 2**, Brasília, Embrapa, 1998. 27p.

DUSI, D.A.A., WILLEMSE M.T.M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: Gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviense. Society Botany**, 41:151-162, 1999.

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**, 60:2032-2036, 1982.

KOLTUNOW A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, 5, 1425-1437, 1993.

LUTTS S., NDIKUMANA J., LOUANT, BP. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomictic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, 78: 19-25, 1982.

MAUSETH, J.D. Flowers and Reproduction. In: SAUNDERS COLLEGE PUBLISHING (ed). **Botany: An Introduction to Plant Biology**. Philadelphia, Pennsylvania — EUA, 1995. p. 228-260.

NDIKUMANA, J. **Étude de l'hybridation entre espèces apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria***. 1985. 210 f. PhD thesis - Louvain-la-Neuve, Université de Louvain.

NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B.M., (ed). **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag, 1984. p. 475-518.

PENTEADO, M.I. DE O., SANTOS, A.C.M. DOS; RODRIGUES, J.F.; VALLE, C.B.DO; SEIXAS, M.A.C.; ESTEVES, A. Determinação de ploidia e quantidade de DNA em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, **Boletim de Pesquisa**, 11, p. 31, 2000.

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. E VALLE, C.B.DO (eds). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. CIAT Publication N° 259. 1996. p. 16-42.

VALLE C.B. DO. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Campo Grande: Embrapa - CNPGC, **Documentos**, 46 p. 1990.

VALLE C.B.D., SAVIDAN Y. 1996. Genetics, Cytogenetics, and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In:—MILES, J.W., MAASS. B.L. E VALLE, C.B.DO (eds). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. CIAT Publication N° 259. 1996. p. 147-163.

VALLE C.B. DO, GLIENKE C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis Newsletter**, 3:11-13, 1991.

WILLESEN, M.T.M & VAN WENT, J.L. The female gametophyte. In: B.M JOHRI (ed). **Embryology of Angiosperms**. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag, 1984. p. 159-191.

WU H.M., CHEUNG, A.Y. Programmed cell death in plant reproduction. **Plant Molecular Biology**, 44: 267-281, 2000.

YANG W. C., SUNDARESAN V. Genetics of gametophyte biogenesis in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Plant Biology**, 3: 53-57, 2000.