

APOMIXIA

Fotos cedidas pelas autoras

Em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes

Vera Tavares de Campos Carneiro

Doutora em Biologia Celular e Molecular Vegetais – Universidade de Paris XI
Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Bolsista de Produtividade em Pesquisa - CNPq
vera@cenargen.embrapa.br

Diva Maria de Alencar Dusi

Doutora em Biologia Celular e Molecular Vegetais – Universidade de Wageningen
Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
diva@cenargen.embrapa.br

O célebre trabalho de pesquisa de Gregor Mendel (1822-1884) com plantas de *Pisum* é considerado o fundamento da Genética. Utilizando uma metodologia experimental rigorosa na realização de cruzamentos e observando as características das plantas na progênie como altura, cor e forma-

to das sementes, cor das flores etc., ele enunciou os princípios da hereditariedade. Mendel concluiu que as características genéticas estão contidas em unidades que existem aos pares nos indivíduos; quando duas delas, responsáveis por uma única característica, estão presentes em um indivíduo, uma é dominante sobre a outra e, na formação dos gametas, as unidades pareadas se separam e se segregam individualmente de maneira aleatória, de modo que cada gameta recebe uma delas. Na busca de mais material para dar suporte às suas deduções, Mendel executou cruzamentos no gênero *Hieracium*. No entanto, encontrou muita dificuldade em repetir os resultados obtidos com *Pisum*. Na progênie dos cruzamentos, muitas plantas pareciam oriundas de auto-fecundação, sem haver transmissão das características paternas, fato esse intrigante, pois seus métodos criteriosos envolviam emasculações. Este trabalho fez com que ele mesmo duvidasse da validade de seus resultados com *Pisum*. Mendel não sabia que estava diante de plantas

que se reproduzem por apomixia (Asker e Jerling, 1992; Nogler, 1994).

Apomixia é o modo de reprodução assexual através de sementes, que ocorre em mais de 300 espécies de 35 famílias de angiospermas (Hanna and Bashaw, 1987). É um processo que acontece apenas na parte feminina da flor, o ovário, mais especificamente no óvulo, e, portanto, tem uma forte conexão com a via de reprodução sexual. Na reprodução sexual, as divisões meióticas promovem uma redução no número de cromossomos para formar um gametófito reduzido. Os embriões são formados após a fertilização com a fusão dos gametas masculino e feminino e, portanto, carregam uma cópia do conjunto de cromossomos de cada progenitor. No desenvolvimento apomítico, a meiose, característica da reprodução sexual, não ocorre ou não é funcional. Desse modo, a oosfera contém o mesmo número de cromossomos somáticos maternos, não ocorre fusão de gametas durante a fertilização e o desenvolvimento do embrião é autônomo, gerando, portanto, uma planta idêntica à planta-mãe.

Importância da apomixia na agricultura

Embora, em geral, as plantas apomíticas não sejam cultivadas, algumas espécies têm alto valor econômico e agrônômico como é o caso das gramíneas. Essas plantas só podem ser usadas na fecundação de plantas sexuais, ou seja, como doadoras de pólen. Além disso, a diferença de ploidia existente entre plantas sexuais e apomíticas impede os cru-

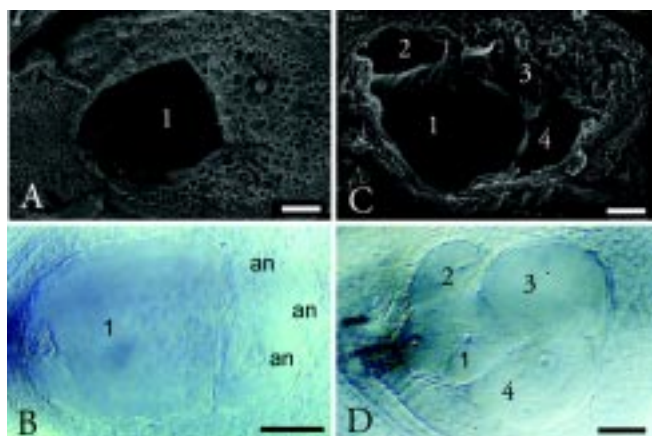


Figura 1. Ovários de flores de *Brachiaria decumbens*. **A**, parte interna do óvulo de planta sexual observada por microscopia de varredura. Nota-se que existe apenas uma cavidade que corresponde a um único saco embrionário meiótico. **B**, ovário clarificado por metil salicilato, mostrando um único saco embrionário meiótico. Note a presença de antípodas (an). **C**, microscopia de varredura da parte interna do óvulo de planta apomítica, mostrando 4 sacos embrionários (1-4). **D**, ovário clarificado por metil salicilato, mostrando 4 sacos embrionários apospóricos (1-4). Barra = 100 μ m para todas as figuras

Tabela 1: Métodos utilizados para detecção de apomixia

Indicadores de Apomixia	Método de detecção	Referências
- Alto nível de polimorfismo morfológico em populações selvagens.	- Observação em locais de ocorrência natural das espécies.	Berthaud, 2001.
- Progênie uniforme obtida de sementes de uma única planta.	- Teste de progênie com sementes de plantas de polinização aberta.	Miles e Valle, 1996.
- Ausência de variabilidade genética em F1 e F2.	- Cruzamentos entre plantas com características distintas.	Miles e Valle, 1991.
- Alto grau de poliploidia.	- Análise citogenética com contagem de cromossomos de ponta de raiz ou citometria de fluxo.	Carman, 1997; Penteadó <i>et al.</i> , 2000.
- Produção de múltiplos embriões.	- Observações citológicas com técnicas de clareamento ou secção de ovários.	Lakshmanan e Ambegaokar, 1984; Vielle <i>et al.</i> , 1995.
- Ausência em diplospóricos ou distúrbio em apospóricos na deposição de calose em paredes de células-mãe do megásporo, díades, tétrades.	- Análises citológicas de ovários frescos ou fixados e corados com azul de anilina e observação com o uso de microscópio de fluorescência.	Naumova <i>et al.</i> , 1993; Naumova e Willemse, 1995; Peel <i>et al.</i> 1997; Dusi e Willemse 1999.
- Distúrbios na meiose	- Análise citogenética da divisão meiótica.	Quarin, 1980; Valle, 1986.
- Grau variável de aborto e esterilidade do grão de pólen.	- Análise histoquímica e teste de germinação do grão de pólen.	Asker e Jerling, 1992; Dusi e Willemse, 1999.
- Ausência de antípodas e presença de múltiplos sacos embrionários apospóricos.	- Análises citológicas de pistilos e ovários por clareamento ou por secções histológicas.	Young <i>et al.</i> , 1979.

zamentos. Apesar disso, sendo a apomixia uma característica controlada por um só fator genético (Savidan 2000), existe a possibilidade de ela ser manipulada tanto por técnicas convencionais de melhoramento quanto por técnicas de engenharia genética.

Com o avanço da biotecnologia e a possibilidade de se transferirem genes entre plantas, independentemente da compatibilidade sexual, o interesse nesse modo de reprodução foi despertado. A combinação da apomixia com a reprodução sexual terá aplicação direta na produção de sementes.

De fato, as vantagens do uso de sementes apomíticas em culturas onde a apomixia não ocorre são inúmeras e já foram discutidas por muitos autores (Hanna e Bashaw, 1987; Asker e Jerling, 1992). O uso controlado da apomixia na agricultura permitirá fixar genótipos de elite e híbridos de qualidade e propagá-los por sementes. Essa característica poderá trazer muitos benefícios como:

- possibilidade de propagar e armazenar por sementes culturas que são propagadas por tubérculos, rizomas ou estacas.
- produção de sementes por pequenos produtores por um número infinito de gerações;

- simplificação da produção comercial de sementes híbridas com conseqüente queda no custo total de produção de sementes;
- simplificação dos programas de melhoramento com conseqüente aumento no número de cultivares adaptados em cada local.

A amplitude do potencial de aplicação da apomixia em qualquer tipo de cultura, desde herbáceas até lenhosas, de anuais a perenes, aumentou o interesse mundial em entender como ocorre esse processo. Análises celulares e moleculares da apomixia vêm sendo realizadas em diferentes espécies e com uso de diferentes técnicas, com vistas a conhecer seu mecanismo.

A apomixia é resultado de um dos três mecanismos: embrionia adventícia, diplosporia ou aposporia.

Na embrionia adventícia, células somáticas, portanto, não reduzidas, do nucelo ou do tegumento interno do óvulo originam um embrião diretamente (Nogler 1984). A formação do embrião adventício ocorre lado a lado com a formação do embrião pela via sexual. Esse processo é conhecido no gênero *Citrus*, porém pouco se conhe-

ce da sua genética que, parece, ser muito complexa.

Os dois outros mecanismos de apomixia são: diplosporia e aposporia. Ambos envolvem a formação de uma estrutura de um gametófito ou saco embrionário e, portanto, são considerados como apomixia gametofítica. Essa é caracterizada pela apomeiose (Nogler, 1984), ou seja, pela formação de um saco embrionário sem completar a redução meiótica. Na diplosporia, a célula mãe do megásporo inicia, mas não completa, a meiose e entra na mitose, e os núcleos do saco embrionário não são reduzidos. Os sacos embrionários formados possuem 8 núcleos e são morfológicamente semelhantes ao saco meiótico. Nesse caso, o processo sexual é completamente comprometido, e, num mesmo óvulo, apenas pode ocorrer um modo de reprodução.

Na aposporia, células do nucelo, denominadas células iniciais apospóricas ou apósporos, entram em mitose diretamente e formam sacos embrionários não reduzidos. Estes possuem oito núcleos como em *Hieracium* ou 4 núcleos como em *Panicum* (Asker e Jerling, 1992). Geralmente o processo sexual é interrompido, mas, nem sempre, o que possibilita a ocorrência de sexuali-

dade e apomixia em um mesmo óvulo. É comum também a ocorrência de vários sacos embrionários apospóricos em um só óvulo em decorrência do aparecimento de diversos apósporos (Fig. 1).

O desenvolvimento do endosperma pode ser autônomo, sem a ocorrência de fertilização do núcleo polar pelo núcleo espermático, ou necessitar de fertilização do núcleo polar, caracterizando, então, a pseudogamia.

Indicadores da apomixia

Existem muitas características que podem ser observadas em plantas que indicam uma possível ocorrência de reprodução apomítica (Czapik, 1994). Entretanto, é sempre necessária a caracterização morfológica e citológica para confirmar a ocorrência da apomixia nas espécies. Os principais indicadores usados para identificação de apomixia em um determinado taxon e respectivos modos de detecção estão apresentados na tabela 1. As referências indicam trabalhos onde se pode encontrar a descrição e o uso dos métodos ou de revisão.

Marcadores moleculares ligados à apomixia vêm sendo procurados em diferentes espécies. Eles facilitarão a detecção precoce e em larga escala da apomixia em análises de híbridos. Alguns marcadores moleculares já foram identificados em populações de plantas de *Pennisetum* (Ozias-Akins *et al.*, 1998) e *Brachiaria* (Pessino *et al.*, 1999), porém ainda não foram encontrados marcadores universais para a apomixia.

A possibilidade de se transferir a apomixia entre as plantas usando técnicas de Biologia Molecular requer, antes de tudo, conhecimento da natureza dos genes envolvidos. Diferentes linhas de pesquisa estão sendo desenvolvidas para o conhecimento básico da reprodução, principalmente dos eventos de desenvolvimento do gametófito feminino e da fecundação.

Estratégias utilizadas para estudo da apomixia

Embora a ocorrência natural da apomixia tenha sido descrita para muitas espécies, seu mecanismo ainda é pouco estudado. As abordagens utilizadas na identificação e na clonagem de genes vão desde a identificação de marcadores moleculares até a construção de bancos de cDNA e estratégias de mutagenese e técnicas de "differential display" (revisto em Pessino *et al.*, 1999 e Savidan, 2000).

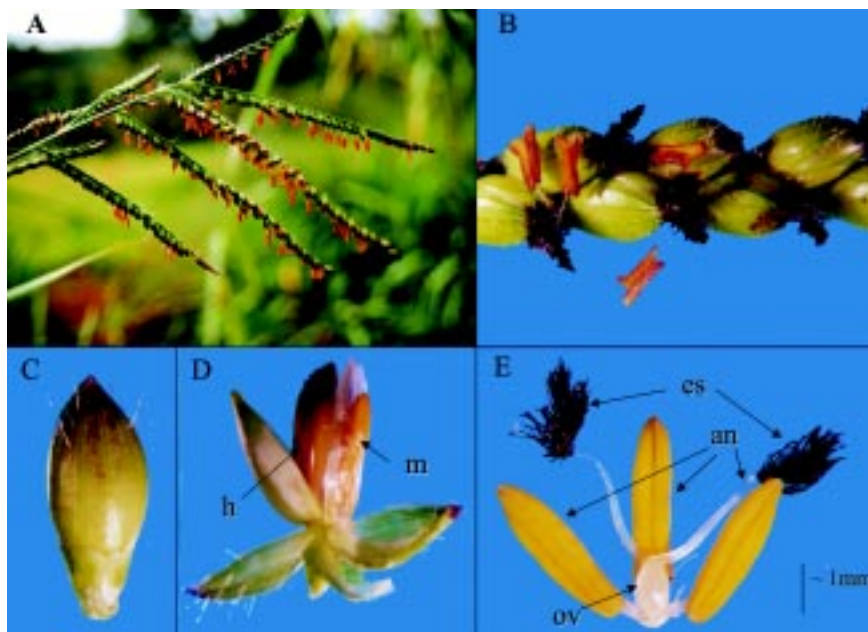


Figura 2. **A**, Inflorescência de braquiária em antese. **B**, Detalhe do racemo durante a antese, mostrando as espiguetas em duas fileiras; **C**, Espiguetas; **D**, Espiguetas abertas, mostrando a flor hermafrodita (h) e a flor masculina (m); **E**, Flor hermafrodita dissecada, mostrando três anteras (an), o pistilo com o ovário (ov) e o estigma (es)

Análises de populações segregantes em algumas culturas, derivadas de cruzamentos entre apomíticos e sexuais têm ajudado a desvendar a transmissão genética da apomixia e a produzir mapas do locus apomítico (Ozias-Akins *et al.*, 1993, 1998), baseado em marcadores moleculares. No entanto, a clonagem a partir desses mapeamentos ainda não foi obtida. A herança da apomixia foi estudada em poucas espécies devido às dificuldades desse tipo de estudo. Normalmente, as plantas apomíticas são poliplóides, a maioria é tetraplóide, enquanto as sexuais são diplóides (Carmen, 1997), o que inviabiliza os cruzamentos. Em *Brachiaria* por exemplo, alguns sexuais poliplóides foram obtidos artificialmente e vêm sendo usados em cruzamentos com apomíticos (Gobbe *et al.*, 1981; Lutts *et al.*, 1984; Pinheiro *et al.*, 2000).

Em *Arabidopsis thaliana*, uma planta modelo em biologia, na qual não ocorre apomixia, os genes responsáveis pelo desenvolvimento têm sido procurados através de mutações que alteram o desenvolvimento do gametófito feminino e da semente. Já foram isolados genes relacionados com a formação do embrião, incluindo aqueles capazes de produzir endosperma ou iniciar a formação do embrião, independentemente de haver fertilização. Os mutantes *fis* (fertilisation independent seeds) (Chaudhury *et*

al., 1997), *fie* (fertilisation independent endosperm) (Ohad *et al.*, 1996) e *mea* (medea) (Grossniklaus *et al.*, 1998) apresentam diferentes estágios de desenvolvimento da semente sem fertilização. Porém, nenhuma dessas sementes mutantes maturam e desenvolvem plantas. Até hoje não existe ainda relato de mutantes que controlem todo o processo apomítico e produzam clones através de sementes.

Resultados como esses revelam aspectos dos principais momentos de desenvolvimento de sementes e contribuem para o conhecimento da apomixia. Estudando-se a biologia de plantas naturalmente apomíticas, busca-se encontrar os genes responsáveis por esse modo de reprodução. Os apomíticos naturais são considerados difíceis experimentalmente, no entanto, suas características completas ainda não foram obtidas em mutantes. Em apomíticos, o gametófito feminino se desenvolve independentemente da meiose e o embrião se desenvolve sem ocorrer fecundação. As sementes resultantes do processo são viáveis.

Utilização de plantas do gênero *Brachiaria* como sistema de estudo da apomixia

O gênero *Brachiaria* (Trin.) Gri-seb. possui espécies que se reprodu-

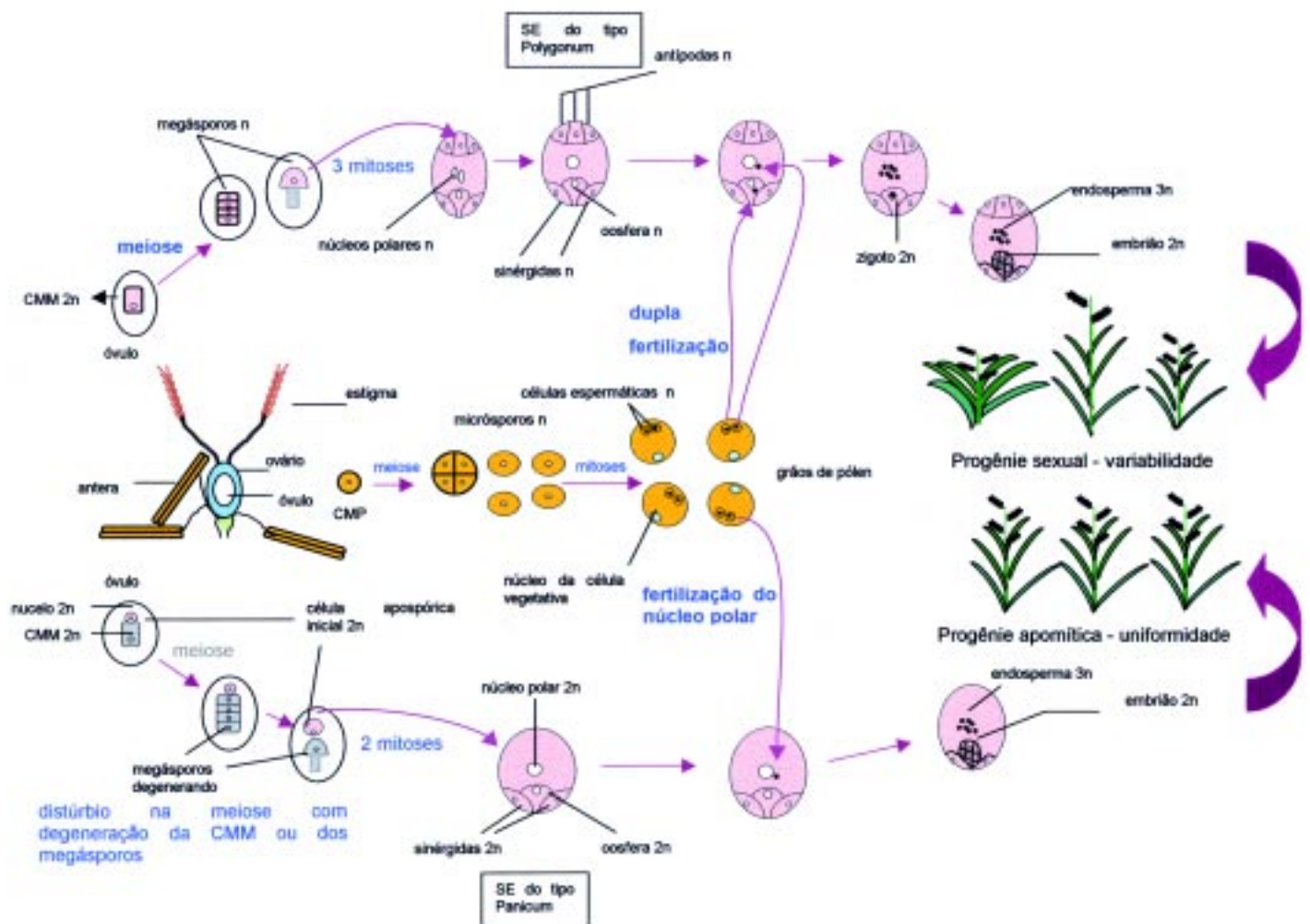


Figura 3. Esquema da reprodução sexual e apomítica (apospórica), que ocorre no gênero *Brachiaria*. Note que na reprodução apomítica, uma célula não reduzida do nucelo se desenvolve em um saco embrionário apospórico do tipo Panicum e que a formação do embrião ocorre sem a fertilização da oosfera. CMM, célula-mãe do megásporo, CMP, célula-mãe do grão de pólen

zem tanto por sexualidade quanto por apomixia, permitindo o estudo comparativo dos dois modos de reprodução. A inflorescência de braquiária é uma panícula com 2 ou até 5 racemos (Fig. 2A) que sustentam as espiguetas dispostas em duas fileiras (Fig. 2B). Cada espiguetta (Fig. 2C) desenvolve duas flores, uma masculina e uma hermafrodita (Fig. 2D). A flor masculina tem 3 anteras e parece desenvolver grãos de pólen normais. A flor hermafrodita possui 3 anteras e um pistilo que contém um ovário e um só óvulo (Fig. 2E).

O desenvolvimento do gametófito masculino e feminino e o do embrião de plantas apomíticas e sexuais de espécies de braquiária está esquematizado na figura 3. Na reprodução sexual, como acontece na maioria das angiospermas, uma célula do nucelo se diferencia da célula-mãe do megásporo (CMM) e passa por redução na meiose, formando 4 megásporos reduzidos. Apenas um deles é funcional e se desenvolve após 3

mitoses sucessivas no saco embrionário do tipo Polygonum, que contém 8 núcleos reduzidos, distribuídos em 7 células: 2 sinérgides, uma oosfera, 3 antípodas e uma célula central, com 2 núcleos polares reduzidos. Próximo à antese, os 2 núcleos polares se fundem para formar um núcleo diplóide. Após a antese, ocorre então a dupla fertilização, que consiste na fecundação da oosfera por uma das células espermáticas do grão-de-pólen, formando o zigoto diplóide que se desenvolverá em embrião, e a fecundação do núcleo diplóide da célula central pela outra célula espermática, para formação do endosperma triplóide. As sementes formadas, por serem resultado de fertilização, darão origem a plantas genética e morfológicamente diferentes.

A reprodução apomítica em braquiária segue o mecanismo de aposporia. Nos óvulos das plantas apomíticas, a CMM se diferencia e pode ou não completar a meiose, dependendo da espécie.

Entretanto, durante a meiose ou ao final dela, a CMM ou os megásporos se degeneram. Nesse momento, células do nucelo ($2n$) se diferenciam e entram diretamente em 2 mitoses, formando sacos embrionários de 4 núcleos não-reduzidos do tipo Panicum. Esses sacos embrionários apresentam 2 sinérgides, uma oosfera e um núcleo polar. Podem ocorrer variações no número de núcleos, principalmente em óvulos que contenham muitos sacos embrionários. O desenvolvimento do embrião é autônomo e ocorre antes ou após a antese. Após a antese, apenas o núcleo da célula central é fertilizado para a formação do endosperma ($3n$). Eventualmente, e dependendo de cada espécie, a CMM completa a meiose, originando um saco embrionário meiótico, que pode ser visualizado sozinho ou acompanhado de sacos apospóricos, num mesmo óvulo (Valle, 1990; Dusi e Willemse, 1999; Araújo *et al.*, 2000).

Na formação do gametófito masculi-

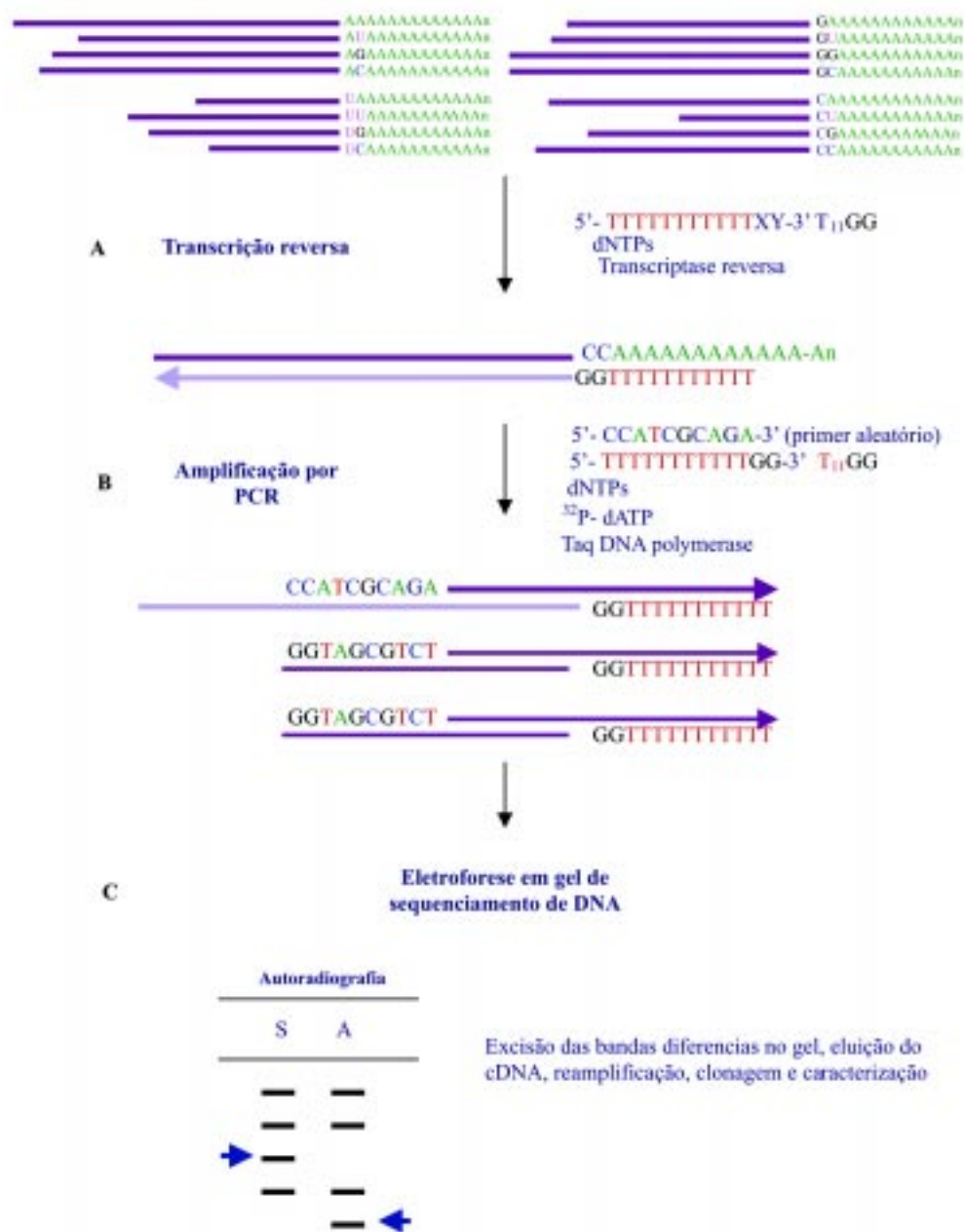


Figura 4. Esquema representativo da técnica de DDRT-PCR em duas amostras de RNA de ovários de plantas sexual e apomítica. **A.** cDNA é sintetizado das subpopulações de RNAs poly(A⁺), com um dos diferentes primers de ancoragem T₁₁XY, no exemplo T₁₁GG. **B.** Amplificação dos cDNAs com T₁₁GG e um dos primers aleatórios, em presença de dATP marcado radioativamente. **C.** Separação dos fragmentos provenientes de ovários de plantas sexuais (S) e apomíticas (A) em gel de sequenciamento e detecção por autoradiografia. As setas indicam os fragmentos diferenciais

no, tanto na sexualidade quanto na apomixia, ocorre redução meiótica, com formação de micrósporos reduzidos que, por sua vez, se desenvolvem em grãos-de-pólen que contém três células reduzidas, uma vegetativa e duas células espermáticas. Dependendo da espécie, plantas apomíticas podem apresentar níveis maiores de esterilidade do grão-de-pólen quando comparadas com as plantas sexuais (Asker e Jerling, 1992).

Para compreender o mecanismo da apomixia e poder levá-lo a outras espécies, utilizando ferramentas da biotecnologia, a Embrapa desenvolve estudos e trabalhos sobre a formação do embrião apomítico (Alves, 2001), sobre o desenvolvimento morfológico dos sacos embrionários das plantas apomíticas e sexuais de *Brachiaria* (Dusi, 1999, Araújo, 2000), a identificação de marcadores moleculares e a duplicação de cromos-

somos de plantas sexuais por colchicina (Pinheiro, 2000) além da transformação direta de plantas através de biobalística (Lentini, 1999). Análises em progênie de cruzamentos interespecíficos sugerem que a herança da apomixia é dominante e ligada a um único locus genético (Valle *et al.*, 1994), o que fundamenta a procura de genes envolvidos no processo (Rodrigues, 2001).

Utilização da técnica de Differential display reverse trans- criptase PCR (DDRT-PCR)

O método “differential display reverse transcriptase PCR” (DDRT-PCR), descrito por Liang e Pardee (1992), é uma técnica que vem sendo utilizada com sucesso na detecção do perfil de expressão gênica em tecidos ou células eucarióticas. Essa técnica está sendo empregada em análises do desenvolvimento vegetal, como o isolamento do gene NAP de *A thaliana*; genes expressos durante o ciclo celular, embriogênese, amadurecimento do fruto e desenvolvimento de sementes, entre outros (revisado por Kuhn, 2001). Também em apomíticos, algumas seqüências relacionadas com a reprodução sexual ou com a apomítica foram obtidas a partir de ovários maduros de *Pennisetum ciliare* (Vielle-Calzada *et al.*, 1996). Estudo semelhante foi conduzido usando ovários maduros de híbridos interespecíficos de *Brachiaria ruziziensis* *B. brizantha* (Leblanc *et al.* 1997). cDNA diferencialmente expresso foi isolado de flores de plantas apomíticas e sexuais de *Paspalum notatum* (Pessino *et al.*, 2001). Em espécies apomítica e sexual de *B. decumbens* foram isoladas seqüências de dois estágios de desenvolvimento do óvulo com apenas quatro combinações de primers (Dusi 2001).

Embora apresente limitações, como amplificação de regiões 3' não-codantes e uma tendência de amplificar genes mais abundantes (McClelland *et al.* 1995), essa técnica tem sido bastante usada, pois é sensível o suficiente para identificar mudanças nos níveis de RNA (Wan *et al.*, 1996) necessitando apenas de pequena quantidade para as análises, fator determinante em plantas cujos ovários são pequenos e de difícil acesso, como em *Brachiaria* (Fig. 2).

DDRT-PCR baseia-se na produção de uma população de fragmentos de cDNAs de diferentes tamanhos pela amplificação de subpopulações específicas de mRNAs com a utilização de transcriptase reversa e PCR (Fig. 4). Em resumo, a partir de uma pequena quantidade de RNA total, é sintetizada a primeira fita de cDNA em uma reação de transcrição reversa da população total de mRNA em subgrupos com um dos 12 primers de ancoragem, T₁₁XY, que reconhecem diferentes frações da população de mRNA. O cDNA resultante é então amplificado por PCR, utilizando-se o mesmo primer de ancoragem

T₁₁XY e um pequeno primer aleatório na presença de dATP marcado. Os produtos marcados são separados num gel desnaturante de seqüenciamento de DNA e visualizados por autoradiografia. O procedimento é igual e simultâneo para os RNAs das amostras que serão comparadas. Assim, num mesmo gel, é possível visualizar as bandas contendo fragmentos de cDNA presentes em uma amostra e ausentes na outra. Esses fragmentos podem ser isolados, reamplificados, clonados e caracterizados.

Para identificar os genes envolvidos na reprodução apomítica de *Brachiaria brizantha*, a comparação do perfil de expressão gênica, utilizando-se a técnica de DDRT-PCR, de ovários de plantas apomíticas e sexuais em diferentes estágios de desenvolvimento do óvulo está sendo realizada.

Considerações Finais

O potencial da engenharia genética vegetal vai muito além da produção de plantas com tolerância a herbicidas ou com resistência a insetos, já existentes atualmente no mercado internacional. Novos genes estão sendo procurados para aumentar a qualidade de alimentos, reduzir custos e aumentar a produção agrícola. A apomixia vem ao encontro dessa perspectiva, contando com ferramentas resultantes da pesquisa em biologia molecular e celular.

Os pesquisadores na área têm manifestado preocupação com as restrições ao acesso à biotecnologia para os agricultores, principalmente por questões econômicas. No caso da apomixia, os pequenos produtores serão diretamente beneficiados pela possibilidade de replantar as sementes produzidas de híbridos, ou de desenvolver variedades adaptadas a condições locais particulares e produzir sementes. Com essa preocupação, foi elaborado um documento de intenção, endossado por diversos pesquisadores em apomixia, ([http:// billie. btny. purdue. edu / apomixis/](http://billie.btny.purdue.edu/apomixis/)) para que o acesso a ela seja amplo e igualitário. Investimento considerável vem sendo feito pelas empresas privadas, apoiando e desenvolvendo pesquisa de ponta em apomixia nos Estados Unidos e Europa. No Brasil, a Embrapa estuda apomixia em *Brachiaria*. Contamos com um programa de melhoramento, onde existe uma coleção de mais de 300 acessos já caracterizados, e desenvolvemos pesquisa re-

lacionada com a sua biologia celular e molecular, enfocando aspectos da reprodução. Consideramos de crucial importância que as instituições públicas, principalmente de países em desenvolvimento como o nosso, assegurem o acesso a essa tecnologia, desenvolvendo novos enfoques de pesquisa para conhecimento dos mecanismos da apomixia.

Referências bibliográficas:

- Alves, E.R., Carneiro, V.T.C. & Araujo, A.C.G. (2001) Direct evidence of pseudogamy in an apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae) *Sexual Plant Reproduction* 14(1) 207-212.
- Araújo, A.C.G., Mukhambetzhano, S., Pozzobon, M.T., Santana, E.F. & Carneiro, V.T.C. (2000) Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae) *Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales- Le Botaniste* Tome, XXIII, 13-28
- Asker, S.E. & Jerling, L. (1992) *Apomixis in Plants*. CRC Press, Boca Raton Ann Arbor London Tokyo. 298p.
- Berthaud, J. (2001). Apomixis and the management of Genetic Diversity. In Savidan, Y.; Carman, J.G. & Dresselhaus, T. eds. *The Flowering of Apomixis, From Mechanisms to Genetic Engineering*. Pp 8-23.
- Chaudhury, A., Ming, L., Miller, C., Craig, S., Dennis, E.S. & Peacock, W.J. (1997). Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4223-4228.
- Carman, J.G. (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. *Biological-Journal-of-the-Linnean-Society* 61 (1): 51-94
- Czapik R. (1994) How to detect apomixis in Angiospermae. *Polish. Bot. Stud.* 8: 13-21.
- Dusi, D.M.A. (2001) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf. Wageningen – Holanda – tese de PhD. 167p.
- Dusi, D.M.A. & Willemsse, M.T.M. (1999) Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: Gametophytic development and reproductive calendar. *Acta Biologica Cracoviensis* series Botanica 41: 151-162.
- Gobbe, J., Swenne, A. & Louant, B-P. (1981) Diploides naturels et autotetraploides induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard: Critè-

- res d'identification. *Agronomie Tropicale* 36: 339-346.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.-P., Hoepfner, M. A. & Gagliano, W.B. (1998). Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a Polycomb-group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280, 446-450.
- Hanna, W.W. & Bashaw, E.C. (1987) Apomixis: Its identification and use in plant breeding. *Crop Science* 27: 1136-1139.
- Kuhn, E. (2001) From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany* 87, 139-155.
- Lakshmanan, K.K. & Ambegaokar, K.B. (1984) Polyembryony. In *Embryology of Angiosperms* (ed. B.M. Johri), pp. 445-474. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Leblanc, O., Armstead, I., Pessino, S., Ortiz, J. P. A., Evans, C., Valle, C. B. d., & Hayward, M. D. (1997). Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualize gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. *Plant Science* 126, 49-58.
- Lentini, Z.; Carneiro, V.T.C.; Manzano, S.J.L. & Galindo, L. (1999) Processo de Regeneração de plantas e transformação genética de espécies de *Brachiaria*, Brasil. PI 9903700-9
- Liang, P., & Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Lutts, S., Ndikumana, J. & Louant, B. P. (1984) 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.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F., & Welsh, J. (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends in Genetics*. 11, 242-246.
- Miles, J.W. & do Valle, C.B. (1991) Assessment of reproductive behavior of interspecific *Brachiaria* hybrids. *Apomixis Newsletter* 3: 9-10.
- Miles, J.W. & do Valle, C.B. (1996) Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement* (ed. J. W. Miles, B.L. Maass & C.B. do Valle), pp. 164-177. CIAT. Embrapa, Cali.
- Naumova T, Den Nijs APM, Willemse MTM (1993) Quantitative analysis of aposporous parthenogenesis in *Poa pratensis* genotypes. *Acta Botanica Neerlandica* 42: 299-312.
- Naumova, T. N. & Willemse, M. T. M. (1995) Ultrastructural characterization of apospory in *Panicum maximum*. *Sexual Plant Reproduction* 8: 197-204.
- Nogler G. A. (1994). Genetics of gametophytic apomixis - A Historical Sketch. *Polish Botanical Studies* 8: 5-11.
- Ohad, N., Margossian, L., Hsu, Y. C., Williams, C., Repetti, P., & Fischer, R. L. (1996). A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9123-9127.
- Ozias-Akins, P.; Lubbers, E.L.; Hanna, W. & McNay, J.W. (1993) Transmission of the apomictic mode of reproduction in *Pennisetum*: co-inheritance of the trait and molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 632-638.
- Ozias-Akins, P.; Roche, D. & Hanna, W.W. (1998) Tight clustering and hemizigosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum* implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proc. National Academy of Science USA* 95: 5127-5132.
- Peel, D. M., Carman, J. G. & Leblanc, O. (1997) Megasporocyte callose in apomictic buffelgrass, Kentucky bluegrass, *Pennisetum squamulatum* Fresen, *Tripsacum* L., and weeping lovegrass. *Crop Science* 37: 724-732.
- Penteado, M.I. de O; Santos, A.C.M. dos; Rodrigues, I.F.; Valle, C.C. do; Seixas, M.A.C. & Esteves, A. (2000) Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. *Boletim de Pesquisa Embrapa* – Embrapa Gado de Corte – Campo Grande 32 p.
- Pessino, S. C., Espinoza, F., Martinez, E. J., Ortiz, J. P., Valle, E. M., & Quarín, C. L. (2001) Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. *Hereditas* 134, 35-42.
- Pessino, S.C.; Ortiz, J.P.A., Hyward, M.D. & Quarín, C.L. (1999) The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas* 130: 1-11.
- Pinheiro, A.A., Pozzobon, M.T.; do Valle, C.B.; Penteado, M.I.O. & Carneiro, V.T.C. (2000) Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Reports* 19: 274-278.
- Quarín, C.L. & Hanna, W.W. (1980) Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction in *Paspalum hexastachyum*. *Crop Science* 20: 69-75.
- Rodrigues, J.C.M., Cabral, G.B. & Carneiro, V.T.C. (2001) Isolation of differentially expressed cDNA sequences from ovaries of sexual and apomictic *Brachiaria brizantha* 2nd International Apomixis Conference, Como – Itália
- Savidan, Y. (2000) Apomixis: genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18: 13-86.
- Valle, C. B. d., Glienke, C., & Leguisamon, G. O. C. (1994) Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter* 7, 42-43.
- Valle, C. B. do (1990) Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. *Documentos* 46, 33pp. EMBRAPA - CNPQC, Campo Grande.
- Valle, C.B. do & Savidan, Y.H. (1996) Genetics, Cytogenetics and Reproductive biology of *Brachiaria*. In *Brachiaria* Biology Agronomy and Improvement (ed. J. W. Miles, B.L. Maass & C.B. do Valle), pp. 164-177. CIAT, Embrapa, Cali.
- Valle, C.B. do. (1986) Cytology, mode of reproduction and forage quality of selected species of *Brachiaria* Griseb. University of Illinois. 90p. PhD thesis.
- Vielle, J.-P.; Burson, B.L.; Bashaw, E.C. & Hussey, M.A. (1995) Early fertilization events in the sexual and aposporous egg apparatus of *Pennisetum ciliari* (L.) Link. *The Plant Journal* 8: 309-316.
- Vielle-Calzada, J.-P., Nuccio, M. L., Budiman, M. A., Thomas, T. L., Burson, B. L., Hussey, M. A., & Wing, R. A. (1996) Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliari* (L.) Link. *Plant Molecular Biology* 32, 1085-1092.
- Wan, J.S., Sharp, S.J., Poirier, G.M.-C., Wagaman, P.C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y.-L., Galindo, J.E., Huvar, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R. & Erlander, M.G. (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnology* 14: 1685-1691.
- Young, B. A., Sherwood, R. T. & Bashaw, E. C. (1979) Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany* 57: 1668-1672.