PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 8
Mov. 2

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

JULIANA KLOSTERMANN ZIEMMER

CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA E GENÉTICA DOS PROCESSOS DE APOMIXIA E EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *IN VITRO* EM MELASTOMATACEAE

Projeto apresentado ao Instituto de Biologia da UNICAMP como pré-requisito para obtenção do título de doutora em Biologia vegetal.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 9
Mov. 2

INTRODUÇÃO

A apomixia é uma forma de reprodução assexuada via sementes, onde o embrião pode se desenvolver a partir de células somáticas de origem nucelar, tegumentar ou do saco embrionário (Koltunow&Grossniklaus 2003, Bicknell&Koltunow 2004). Tal estratégia reprodutiva é expressa por meio de alterações temporais e espaciais em fases importantes do desenvolvimento sexual, com a eliminação ou alteração da meiose e fecundação (Carman 1997; Koltunow&Grossniklaus 2003; Hand&Koltunow 2014).Este tipo de reprodução já foi reportada para 78 famílias de angiospermas (Hojsgaardet al. 2014), algumas com número expressivo de espécies apomíticas, como Poaceae, (Sharma et al. 2014; Boldrini et al. 2006; Hojsgaard et al. 2008; Albertini et al. 2005; Niemann et al. 2012), Asteraceae (Whitton et al. 2008; Hand et al. 2015), Rosaceae (Dobes et al. 2015; Burgess et al. 2014) e Melastomataceae (Goldenberg& Shepherd 1998; Mendes-Rodrigues& Oliveira 2012; Caetano et al. 2013a, b;Maia et al. 2016).Emespécies apomíticas obrigatórias a polinização é dispensável,ocorrendo o desenvolvimento do endosperma de forma autônoma (Koltunow&Grossniklaus 2003). Em outros casos,a polinização faz-se necessária (pseudogamia) paradesencadear o desenvolvimento partenogenético da oosfera e a formação do endosperma (Asker&Jerling 1992).

A apomixia é dividida em duas categorias: (1) esporofítica (ou embrionia adventícia) quando o embrião origina-se a partir de células somáticas do óvulo sem a formação de um saco embrionário (Asker&Jerling, 1992; Hand&Koltunow, 2014), e (2) gametofítica, quando o embrião origina-se a partir da oosfera de um saco embrionário não reduzido. Neste último caso, se o saco embrionário deriva de uma célula-mãe de megásporo e a meiose é alterada ou ausente, o embrião é obtido via diplosporia,ou quando se originapor mitose de células nucelares o embrião é obtido via aposporia(Koltunow et al. 1998; Whitton et al. 2008; Tucker&Koltunow 2009).

Estudos demonstram que a apomixia pode ser uma consequência dealteraçõesepigenômicasresultante da hibridização interespecífica e poliploidização, induzindo mudançasna expressão dos genes e desregulando o

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 10
Mov. 2

desenvolvimento reprodutivo (Garcia-Aguilar et al.2010). Algumas pesquisas envolvendo espécies apomíticas naturais e mutantes sexuais levaram à identificação de *loci* e genes candidatos que podem ser responsáveis pela sobreposição da apomixia na via sexual, no entanto, genes causais ainda não foram identificados (Hand&Koltunow 2014), tornando importante a compreensão dos genes expressos especificamente ou diferencialmente durante a embriogênese e a formação do saco embrionário (Fei et al. 2019).

A via de metilação do DNA pode desempenhar papel importante no desenvolvimento de gametófitos, sendo registradas diferenças entre espécies apomíticas e sexuadas (FEI et al. 2019). Garcia-Aguilar et al. (2010) verificaram que os genes DMT102 e DMT103 em óvulos de *Zeamays* são expressos em domínios restritos dentro e ao redor de células germinativas, sugerindo que as vias de metilação do DNA são críticas para o desenvolvimento do gametófito e exercemimportantes funções na reprodução apomítica e sexual. Em *Poapratensis* o gene SERK (*Somaticembryogenesis receptor kinase*) está relacionado ao desenvolvimento do saco embrionário e pode transferir produtos de genes sinalizadores para compartimentos atípicos (Albertini et al. 2005).

Embora a apomixia tenha sido estudada extensivamente nos últimos anos, principalmente pelo seu potencial uso na agricultura, para o melhoramento genético de plantas, os mecanismos moleculares que regulam esse fenômeno foram pouco compreendidos (Pupilli&Barcaccia 2012; Galla et al. 2017; Fei et al. 2019). Em populações naturais de espécies apomíticas a base genética pode ser muito mais complexa do que tem sido proposto (Whitton 2008). Diversos trabalhos mencionam que a apomixia levaria a genótipos fixos e desenvolvimento de sementes clonais, porém, fatores como ancestralidade de linhagens apomíticas, retrocruzamento com parentes sexuais, sexualidade facultativa e mutações contribuem para a alta diversidade genética de apomíticas (Cosendai&Horandl 2010). Um estudo com populações de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomaceae), uma apomítica obrigatória tropical, demonstrou alta diversidade genética (74%) entre populações e menor diversidade (24%) dentro das populações (Dias et al. (2017). Segundo os autores tal diversidade pode ocorrer devido a meiose restitucional, poliploidia e possivelmente por alterações genômicas.Testes de progênies possibilitariam a determinação da proporção da variação genética dessas espécies.Além disso,

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 11
Mov. 2

outros parâmetros, como o coeficiente de herdabilidade, poderiam ser estimados.

Melastomataceae, uma família subtropical com cerca de 4.500 espécies (Renner et al., 2010), tem se destacado pelo elevado número de espécies apomíticas, principalmente na tribo Miconieae, onde se concentram grande parte dos estudos (Goldenberg & Shepherd 1998; Goldenberg &Varassin 2001; Cortez et al. 2012; Santos et al. 2012; Caetano et al. 2013a, b; Maia et al. 2016; Caetano et al.2017; Dias et al, 2017; Caetano et al., 2018).A maioriados trabalhos trazem informações sobre os mecanismos citológicos da apomixia e sua relação com a sexualidade em Miconieae. A apomixia também já foi descrita em representantes de Dissochateae + Sonerileae (Subramanyan 1944), Henrietteeae (Melo & Machado 1996), Melastomeae, Merianieae, Microlicieae (Mendoza-Cifuentes& Fernández-Alonso 2012) e Rhexieae (Renner 1989). Os estudos demonstram que eventos de poliploidia, hibridação e baixos níveis de esterilidade polínica estão relacionados aos casos de apomixia no grupo (Goldenberg & Shepherd, 1998; Goldenberg &Varassin 2001; Cortez et al. 2012; Caetano et al. 2013b, Caetano et al. 2018).

A chave para a compreensão da apomixia em Melastomataceae pode estar no cruzamento entre dados de biologia celular e molecular. O estudo da indução e controle da morfogênese em um ambiente*in vitro* oportuniza o estudo da célula, tecido, órgão ou organismo inteiro, facilitando grandemente a obtenção de uma grande quantidade de propágulos. Dentre as possíveis técnicas de cultivo*in vitro*de plantas destaca-se a embriogênese somática (ES).

A ES *in vitro* pode ser definidacomo a reestruturação do desenvolvimento de células somáticas em direção a uma rota embriogênica, e constitui a base de totipotência celular em plantas superiores (Karami et al., 2009). A ES envolve a desdiferenciação de uma ou mais células somáticas e subsequente rediferenciação (reprogramação), resultando na produção de células características de uma planta madura (Rose et al., 2010).

A ES segue um padrão morfogenéticoanálogo ao dos embriões zigóticos, formados de forma gametofítica, apresentando estágios de desenvolvimento embrionário similares (Zimmermann, 1993; Goldberg et al., 1994). Diferentemente de seu análogo zigótico, embriões somáticos podem ser facilmente manipulados e as condições de cultivo podem ser controladas.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 12
Mov. 2

Estas características fazem da ES um modelo eficiente para o estudo de aspectos morfológicos, fisiológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o início e desenvolvimento de plantas superiores (Zhang et al., 2007; Karami et al., 2009).

Estudos sobre ES em Melastomataceae foram realizados com algumas espécies de interesse ornamental, com objetivo de propagação massal (He, Dai &Ma 2009; Ma et al. 2017), no entanto os relatos sobre o uso dessa técnica em espécies da família ainda são incipientes. Para a espécie *Melastomaaffine* D. Don., Ma et al. (2007) induziram a embriogênese somática direta a partir de explantes de gemas axilares imaturas em meio contendo ácido naftalenoacético (ANA) e citocininas.Entre as citocininas testadas, o thidiazuron (TDZ) apresentoumelhores resultados na indução da ESquando comparado a 6-benzilaminopurina e a cinetina. Outros estudos sobre ES em Melastomataceae devem ser conduzidos para preencher as lacunas existentes em relação às técnicas de micropropagação, bem como, para explorar seu potencial para a compreensão de diversos fenômenos no grupo.

Neste contexto,o presente trabalho propõe investigar o processo apomítico em três espécies de Melastomataceae: *Leandra australis*(Cham.) Cogn. (apomítica obrigatória), *Miconia hyemalis* St. Hil. &Naud. exNaud. (apomítica facultativa) e *Miconia sellowiana* (DC.) Naudin (sexuada) em um cenário diferente do que já foi estudado. Serão utilizadas três principais abordagens: 1) análises morfoanatômicase de expressão gênica durante o processo de embriogênese somática *in vitro* das espécies alvo; 2) Estimativa do tamanho do genoma nuclear das espécies alvo por citometria de fluxo; 3) Caracterização genotípica das progênies geradas *in vivo* pelas três espécies alvo.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar, utilizando análises morfoanatômicas e genéticas, os processos de apomixia e embriogênese somática *in vitro* em três espécies de Melastomataceae: *Leandra australis* (apomítica obrigatória), *Miconia hyemalis* (apomítica facultativa) e *Miconia sellowiana* (sexuada).

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 13
Mov. 2

Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo para a indução da embriogênese somática *in vitro* das três espécies-alvo;
- Caracterizar morfoanatomicamente o processo de embriogênese somática *in vitro* das três espécies alvo;
- Quantificar os níveis de expressãode genes associadosao processo apomíticonas três espécies alvo;
- Estimar o tamanho do genoma nuclear das espécies alvo por citometria de fluxo;
-Caracterizar genotipicamente as progênies geradas *in vivo* pelas três espécies alvo.

3 METODOLOGIA

3.1 Espécies estudadas

Serão utilizadas três espécies para este estudo, sendo: *Leandra australis* (Cham.) Cogn., apomítica obrigatória (Goldenberg &Varassin 2001), *Miconia hyemalis*A.St.-Hil. &Naudin, apomítica facultativa (Maia et al. 2016) e *Miconia sellowiana*(DC.) Naudin, sexuada (Maia et al. 2016).

3.1.1 *Leandra australis*(Cham.) Cogn.

Subarbustos a arbustos 0,4-3m; pecíolo 0,9-3,6cm; lâmina 4,5-17x2,2-10cm, papirácea a cartácea, ovada elíptica, base arredondada a cordada, margem crenulado-ciliolado, ápice agudo-acuminado ou obtuso-apiculado, domácias ausentes, 5 nervuras acródromas. Flores 5-meras, cálice com tubo, lacínias reflexas, persistentes, conectivo não prolongado, inapendiculado, ovário ínfero, glabro (Souza &Baumgratz, 2009). Distribui-se desde o estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. Produz flores e frutos em todos os meses do ano (Baumgratz&Souza, 2015).

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 14
Mov. 2

3.1.2 *Miconiahyemalis*A. St.-Hil. &Naudin

Arbustos a arvoretas 0,7-5 m alt., folhas com pecíolo 0,4-2,4cm.; lâmina 2,8-13(-16)×1-5,6cm, discolor, cartácea a coriácea, oval, elíptica, oval-lanceolada ou lanceolada, base subcordada a arredondada, ápice agudo a curtamente acuminado, margem denteada, nervuras 3 ou 3+2, acródromas basais a curtamente suprabasais. Panículas de glomérulos, 1,7-7(-13,5)cm, terminais, ramos basais com 1-2 pares de glomérulos ou pontos de ramificação. Flores 5(-6)-meras; hipanto 2-2,4mm compr.; cálice caduco, com lacínias; estames 10(-12), anteras brancas, biporosas, conectivo com dois lobos ventrais e um dorsal; ovário 3-locular, com tricomas ou raro glabro no ápice, baga imatura verde, madura enegrecida; 10-15 sementes (Goldenberg, 2004). Ocorre desde São Paulo até o Rio Grande do Sul e Uruguai, coletada com flores entre junho e novembro e com frutos entre fevereiro e junho (Goldenberg, 2009).

3.1.3 *Miconia sellowiana*(DC.) Naudin

Arbustos ou árvores, 2-15m alt.; folhascom pecíolo 0,5-1cm compr.; lâmina 5-11×1-3cm,concolor a subconcolor, cartácea a membranácea,lanceolada a oblongo-lanceolada, base atenuada edecurrente, ápice acuminado a caudado, margemdistintamente serreada exceto no terço inferior, nervuras 3 ou 3+2, acródromas suprabasais. Flores 5-meras; hipanto 1,3-1,8mm compr.; cálice caduco;pétalas 1,4-1,8×1-1,4mm; estames 10, isomorfos,anteras brancas, conectivo levemente prolongado; ovário3-locular, papiloso no ápice, baga imatura amarela, madura enegrecida, 6-9 sementes. Ocorre desde Goiás e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul;Floresce em fevereiro e entre maio e dezembro, com frutos entre agosto e janeiro e em maio (Goldenberg 2004).

3.2Material vegetal e condições de cultivo

Botões florais de *Leandra australis*, *Miconia hyemalis* e *Miconia sellowiana* serão coletados de populações naturais localizadas no Campus

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 15
Mov. 2

Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, localizado no município de Curitiba, Paraná, no Parque Estadual do Guartelá, localizado no município de Tibagi, Paraná, e no Parque Estadual Pico do Marumbi, no município de Piraquara, Paraná. Os experimentos serão conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal, do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Após a coleta do material os explantes serão submetidos a desinfestação através da imersão em álcool 70% por 30 segundos, e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 0,5% de cloro ativo por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os ovários serão lavados em água destilada autoclavada. Os explantes serão excisados e os óvulos serão removidos, isolados e inoculados em placas de Petri contendo 25 mLdo meio de cultura básico. O meio de cultura será suplementado com20 g L^{-1} de sacarose, 1g L^{-1} de glutamina, 0,5 g L^{-1} de mio-inositole geleificadocom 2 g L^{-1} de Phytagel™. Nesta etapa serão testados 6 diferentes tratamentos suplementados com concentrações crescentes do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): 0, 5, 10, 15, 20 e 25 µM. O pH do meio de cultura será ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavado a 121 °C, durante 15 minutos. As culturas serão mantidas em sala de crescimento, na ausência de luz, com temperatura controlada de 25°C ± 2°C.

A taxa de indução da ES será avaliada após 10, 20 e 30 dias de inoculação em meio de cultura de indução, com auxílio de estereomicroscópio. O delineamento experimental utilizado será o de blocos completamente casualizados, com 6 repetições de cada tratamento (placa de Petri), com cada placa contendo cerca de 20 óvulos. Os dados obtidos serão submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de separação de médias SNK (95%). Será utilizado o software Statistica® 6.0 para auxílio nos procedimentos estatísticos.

3.3 Análises morfoanatômicas

Os óvulos, utilizados como explantes, e embriões somáticos obtidos das três espécies alvo serão coletados em diferentes estádios de desenvolvimento

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 16
Mov. 2

e fixados em paraformaldeído 2% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, lavados em tampão fosfato e desidratados em série etílica gradual.

As amostras serão infiltradas e incluídas em hidroxietilmetacrilato (HistoresinaLeica®), de acordo com as instruções do fabricante. Os blocos contendo as amostras serão seccionados em 5-7 µm de espessura em micrótomo rotativo e as secções serão coradas com azul de toluidina 0,05% em pH 6,8 (O' Brien et al. 1964). A visualização será realizada em microscópio de luz e as imagens capturadas em fotomicroscópio óptico com câmera digital acoplada.

3.4Análises de expressão de genes relacionados à apomixia

Para as análises de expressão gênica serão utilizados óvulos maduros das três espécies de Melastomataceae (explantes) e embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento obtidos durante o processo de ES*in vitro*.Serão coletadas três replicatas biológicas, consistindo de 100 mg de massa fresca, em cada ponto de coleta de cada espécie avaliada. As amostras coletadas serão infiltradas em RNAlater® a 4°C por 24h. Posteriormente, as amostras serão submetidas à centrifugação, visando a remoção do RNAlater®, e armazenados em freezer -80°C até a posterior extração de RNA total. As sequências de DNA codificantes (CDS) dos genes candidatos envolvidos no processo de apomixia serão selecionados com base no trabalho de Sharbel et al. (2010). As sequências homólogas destes genes serão usadas para o mapeamento contra dados de sequenciamento de DNA genômico de *Miconia,*cedidas, gentilmente, pelo New York Botanical Garden. Os contigs obtidos serão submetidos à busca em tBLASTn (e-value> e^{-10}) (Altschul et al. 1990). Dessa forma, sequências específicas para *Miconia* poderão ser utilizadas para o desenho dos iniciadores através do software Primer Express ® 3.0v.

O RNA total será extraído a partir de 100 mg de matéria fresca com o kit RNeasyMini Kit (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total será quantificado por espectrometria em Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific), por fluorometria em Qubit (Thermo Fisher Scientific)

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 17
Mov. 2

e armazenado em freezer -80 °C até sua utilização. A integridade do RNA extraído será avaliada em gel desnaturante FA (formaldeído agarose) 1,2% (Sambrook et al., 1989). Alíquotas de 2 µg dos RNAs totais extraídos serão utilizados para a síntese dos cDNAs, utilizando-se o kit Omniscript RT (Qiagen, EUA), segundo as instruções do fornecedor. Após o estabelecimento das condições de qPCR, a quantificação relativa dos cDNAs de interesse será realizada utilizando-se como controle os seguintes genes descritos por Sharbel et al. (2010): ACT2 e UBQ10 (*housekeeping*), AT3G43740, AT2G23940, AT3G62422, AT1G67230, AT5G64250, AT1G76130, AT5G21070, AT1G33120, AT5G17920, AT1G18210, AT1G15880 e AT3G20740.1 As reações de PCR serãorealizadas com SYBR® Green PCR Master Mix® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5Estimativa do tamanho do genoma nuclear por citometria de fluxo

A estimativa do conteúdo de DNA nuclear será baseada na metodologia descrita por Dolezel et al. (2007). Serão utilizadas folhas frescas jovens de no mínimo três indivíduos de cada espécie alvo. Folhas frescas jovens de *Raphanussativus* L. 'Saxa" (2C DNA content = 1,11 pg) serão utilizadas como padrão interno. Cerca de 20 mg de tecido vegetal serão utilizados para o protocolo de suspensão de núcleos. O material vegetal será fragmentado sobre um placa de Petri com adição de 1 mL do tampão de isolamento de núcleos. Os tampões de isolamento de núcleos LB01, Galbraith's e Tris.MgCl2 serão testados e o que apresentar um melhor desempenho será selecionado. Todo o procedimento será realizado sobre gelo e os materiais utilizados serão previamente refrigerados a 4 °C. A suspensão obtida será filtrada em rede de nylon (tamanho do poro 42 µm) e em seguida será adicionado iodeto de propídeo (PI) para uma concentração final de 50 µg ml–1 simultaneamente com RNase 50 µg ml–1. As amostras serão incubadas por até uma hora antes da leitura. Serão lidas pelo menos 5000 partículas de cada replicata. As amostras serão analisadas em um citômetro de fluxo, no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR. Os histogramas de intensidade de fluorescência relativa obtidos serão analisados quanto às médias das áreas

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 18
Mov. 2

dos picos. O conteúdo de DNA nuclear será calculado de acordo com a equação: Quantidade de DNA (pg/2C) = [fluorescência média do pico G1 da amostra/fluorescência média do pico G1 da referência] x conteúdo de DNA (pg/2C) da referência.

3.6 Caracterização genotípica das progênies geradas *in vivo*

3.6.1. Material vegetal

As amostras vegetais para a caracterização genotípica serão obtidas de progênies geradas a partir da germinação de sementes coletadas de cinco plantas-mãe de cada espécie alvo.

Frutos maduros de cinco plantas-mãe de cada espécie (*L. australis*, *M. hyemalis* e *M. sellowiana)* serão coletados em três populações distintas. As coletas serão realizadas em populações naturais localizadas no Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, localizado no município de Curitiba, Paraná, no Parque Estadual do Guartelá, localizado em Tibagi, Paraná, e no Parque Estadual Pico do Marumbi, em Piraquara, Paraná. Após a coleta, os frutos serão levados ao laboratório para remoção das sementes. Para a germinação, as sementes serão colocadas em placas de Petri com duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada. As placas de Petri serão colocadas em um germinador, com temperatura constante de 25°C ± 2°C. As plântulas obtidas serão colocadas em caixas plásticas, sob luz natural e temperatura controlada (25 ± C ± 2°C). Quando apresentarem dois pares de folhas, as plântulas serão transferidas, individualmente, para vasos, contendo substrato comercial e composto orgânico. Regas serão feitas de acordo com a necessidade.

3.6.2 Extração de DNA

Folhas jovens de no mínimo 20 indivíduos serão coletadas das progênies de cada espécie para extração do DNA. Após desidratação das folhas em sílica gel, o DNA genômico total será extraído com o kit DNeasyPlant (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 19
Mov. 2

3.6.3 Amplificação com PCR

Dezenove *primers* serão testados para amplificar as amostras de DNA por PCR: 10 *Inter SimpleSequenceRepeats* (ISSR) descritos por Dias et al. (2017) (Tabela 1) e 9 microssatélites (SSR) descritos por Le Roux&Wieczorek (2008) (Tabela 2).

Para as análises por ISSR ascondições de PCR serão otimizadas para cada *primere* apenas aqueles que gerarem bandas claras e reproduzíveis serão utilizados. A separação dos fragmentos obtidos via PCR será realizada por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

Os fragmentos amplificados por ISSR serão pontuados visualmente, assumindo que produtos amplificados de tamanho molecular similar, amplificados com o mesmo *primer*, serão homólogos. Esses fragmentos serão pontuados em termos de um código binário como presente (1) ou ausente (0). Apenas dados de bandas não ambíguas e claras serão consideradospara a análise de dados e para construir uma matriz de genótipos de ISSR.

Tabela 1 – Sequência dos primers ISSR utilizados

Nome	Sequência do primer[a]
Aw3	$(GA)_7RG$
Becky	$(CA)_7$ YC
Dat	$(GA)_7RG$
Goofy	$(GT)_7YG$
Jonh	$(AG)_7YC$
Manny	$(CAC)_4RC$
UBC 827	$(AC)_8G$
UBC 840	$(GA)_8YT$
UBC 880	$(GGAGA)_3$
UBC 898	$(CA)_6RY$

[a]Y = C ou T; R = A ou G.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 20
Mov. 2

Para as análises por SSR, serão utilizados *primers* caracterizados para *M. calvescens*por Le Roux&Wieczorek (2008). As condições de PCR serão otimizadas a partir do descrito por Le Roux&Wieczorek (2008) e a genotipagem será realizada em sequenciador automático de DNA daABI-PRISM 377 (AppliedBiosystems).

Tabela 2 – Sequência de *primers* SSR

Nome	Sequência do primer (5'- 3')
B2	F: FAM-GTCGCGTTTCCAGAATACTG R: CTACCACCGTGCAAAGAATC
B9	F: FAM-TTCCCTTATGCGACGAGTAC R: GGTCCATTCACACCACAAAC
B(102)a	F: NED-GGTGCCGAAGCATTGCCTG R: AGCCACGATGAGTCTGCTG
B109	F: HEX-GCCACCTATCCGAACATCG R: AGGCTGTGCCGCCAACGAC
B117	F: HEX-TTGGTGTCCCTCTTGCTCC R: ACAAGCTCTTTACTGTGGTTTCC
C103	F: HEX-AGAAGAACGAGGCAAACTGC R: TCCTCCCGCACAAGCCCAG
D101	F: FAM-TGCTATCGCCGAACCACTG R: GTTGGATTCGGACACCATCG
D114	F: NED-TGGCTTTGATTACGATTATCTG R: GTTAGGTTAGCAGGTGATTTG
D118	F: HEX-GGATCTGGCAATTTATTTC R: TGAAAGAGGGAGAAGTAGC

3.6.4 Análise de dados

Os dados obtidos pela pontuação de presença (1) ou ausência (0) de fragmentos amplificados serão montados em uma matriz de dados.Os software POPGENE versão 1.3.2 (Yeh& Boyle 1997) e GenALEx versão 6.5 (Peakall&. Smouse 2012) serão utilizados para gerar as frequências gênicas das progênies geradas, bem como a matriz de distâncias genéticas de Nei (1972) entre as progênies.

Para a estimativa de diversidade genética será avaliado a heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e a porcentagem de *loci* polimórficos (P) com software POPGENE. O número de alelos por *locus* (N_A) em cada progênie será calculado pela soma de alelos

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 21
Mov. 2

para todos os *loci* polimórficos e dividido pelo número total de *loci*, no software POPGENE. O número efetivo de alelos por *locus* (NE) será calculado utilizando o programa POPGENE.

A análise das relações genéticas entre asprogênies será realizada através de uma análise de coordenadas principais (PCoA) para todas as progênies, usando o programa GenAlEx. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HEW) dentro e entre as progênies será calculado com o programa POPGENE. O fluxo gênico indireto (Nm) será calculado com o software POPGENE. A distribuição da diversidade genética nas progênies será avaliada pelo método de Análises da Variância Molecular (AMOVA) com o programa GenAlEX. Será realizado uma análise Bayesiana da estrutura das progênies em todo o conjunto de dados usando o programa STRUCTURE 2.3 (Prichard et al. 2010) para detectar a estrutura populacional e estimar o número de agrupamentos genéticos (K). Seguindo as configurações de marcadores dominantes do programa, o modelo "*admixture*" será usado, e as frequências alélicas correlatas entre as populações serãoadmitidas.

5 CRONOGRAMA

tividades	2019						2020					
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Coleta de explantes p/ ES		x	x	x	x	x						
Indução da ES		x	x	x	x	x	x					
Coleta de amostras p/ análises anatômicas					x	x	x					
Germinação das sementes *in vivo*					x	x	x					
Coleta dos frutos para germinação das sementes					x	x	x	x				
Caracterização genotípica das progênies					x	x	x	x	x			
Análise dos resultados								x	x			
Redação da tese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Atividades	2020						2021					
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Confecção de lâminas						x	x					

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 22
Mov. 2

Análises em microscopia de luz							x	x				
Descrições anatômicas							x	x				
Cumprimento de créditos		x	x	x	x	x						
Redação da tese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Atividades	2021						2022					
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Análises de expressão gênica	x	x	x									
Análises em citômetro de fluxo				x	x	x						
Divulgação em eventos		x	x		x	x						
Cumprimento de créditos		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
Redação da tese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Atividades	2022						2023					
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Redação da tese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Divulgação em eventos		x	x		x	x						
Entrega da tese												x

6 REFERÊNCIAS

Albertini E, Marconi G, Reale L, Barcaccia G, Porceddu A, Ferranti F, Falcinelli M (2005) SERK and APOSTART. Candidate genes for apomixis in Poa pratensis. Plant Physiol 138 (4):2185-2199.

Asker, S.E. &Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton.

Baumgratz, J.F.A.,Souza, M.L.D.R. 2015. *Leandra* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9507>.

Bicknell, R.A. &Koltunow, A.M. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. The Plant Cell 16: S228-S245.

Boldrini KR, Pagliarini MS, do Valle CB (2006) Cell fusion and cytomixis during microsporogenesis in *Brachiariahumidicola*(Poaceae). South African J Botany 72(3):478–481.

Burgess MB, Cushman KR, Doucette ET, Talent N, Frye CT, Campbell CS (2014) Effects of apomixis and polyploidy on diversification and geographic distribution in Amelanchier (Rosaceae). Am J Bot 101(8):1375–1387.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 23
Mov. 2

Caetano A.P.S., Cortez P.A., Teixeira P.A., Oliveira P.E., Carmello-Guerreiro S.S. (2017) Unusual diversity of apomictic mechanisms in a species of Miconia, Melastomataceae. Plant Systematic and Evolution (in press.).

Caetano A.P.S., Simão, D.G., Carmo-Oliveira, R. & Oliveira, P.E. 2013a. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. PlantSystematicsand Evolution 299(7):1253–1262.

Caetano, A. P. S., Cortez, P. A., Teixeira, S. P., Oliveira, P. E., & Carmello-Guerreiro, S. M. (2018). Unusual diversity of apomictic mechanisms in a species of Miconia, Melastomataceae. Plant systematics and evolution, 304(3), 343-355.

Caetano, A.P.S., Teixeira, S.P., Forni-Martins, E.R. &Carmello-Guerreiro, S.M. 2013b. Pollen insights into apomictic and sexual *Miconia*(Miconieae, Melastomataceae). International Journal of Plant Sciences 174(5):760–768.

Carman J.G. (2007) Do duplicate genes cause apomixis? In Hörandl E., Grossniklaus U., Van Dijk P.J., Sharbel T. (Eds), Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives (Eds) Ruggell A.R.G.G.:169-194.

Cortez, P.A., Carmello-Guerreiro, S.M. & Teixeira, S.P. 2012. Understanding male sterility in Miconia species (Melastomataceae) – a morphological approach. Australian Journal of Botany 60(6): 506-516.

Cosendai A.C., Horandl E. 2010. Cytotype stability, facultative apomixis and geographical parthenogenesis in Ranunculus kuepferi (Ranunculaceae). Annals of Botany, 105, 457–470.

Dias A.C.C., Serra A.C., Sampaio D.S., Borba F.I., Bonetti A.M., Oliveira P.F. (2017) Unexpectedly high genetic diversity and divergence among populations of the apomitic Neotropical tree Miconia albicans. Plant biology, 20(2), 244-251.

Dobeš C, Lückl A, Kausche L (2015) Parallel origins of apomixes in two diverged evolutionary lineages in tribe *Potentilleae*(Rosaceae). Bot J Linnean Soc 177:214–229 doi:10.1104/pp.105.062059

Fei, X., Shi, J., Liu, Y., Niu, J., & Wei, A. (2019). The steps from sexual reproduction to apomixis. Planta, 249(6), 1715-1730.

Galla G, Zenoni S, Avesani L, Altschmied L, Rizzo P, Sharbel TF, Barcaccia G (2017) Pistil transcriptome analysis to disclose genes and gene products related to aposporous apomixis in *Hypericum perforatum*L. Front Plant Sci 8:79.

Garcia-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2010) Inactivation of a DNA methylation pathway in maize reproductive organs results in apomixis-like phenotypes. Plant Cell 22(10):3249–3267.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 24
Mov. 2

Goldberg RB, De Paiva G, Yadegari R. (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. Science. 266:605–614.

Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. PlantSystematicsand Evolution 211(1): 13-29.

Goldenberg, R. &Varassin, I.G. 2001. Sistemas reprodutivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 24(3): 283-288.

Goldenberg, R. (2004). The genus *Miconia* (Melastomataceae) in theStateof Paraná, Brazil. Acta BotanicaBrasilica, 18(4), 927-947.

Goldenberg, R. 2009. *Miconia* Ruiz &Pav., In. Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M. & Martins, S.E. eds. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, v.6, p. 73-103.

Hand M.L., Koltunow A.M. (2014) The genetic control of apomixis: asexual seed formation. Genetics, 197, 441-450.

Hand ML, Vit P, Krahulcova A, Johnson SD, Oelkers K, Siddons H, Chrtek J Jr, Fehrer J, Koltunow AM (2015) Evolution of apomixes loci in *Pilosella*and *Hieracium*(Asteraceae) inferred from the conservation of apomixis-linked markers in natural and experimental populations. Heredity (Edinb) 114(1):17–26.

He, C., Dai, S., & Ma, G. (2009). Callus induction and plant regeneration in Tibouchinaurvilleana (DC.) Cogn. Propagation of Ornamental Plants, 9(2), 59-64.

Hojsgaard D, Schegg E, Valls JFM, Martínez EJ, Quarin CL (2008) Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum*species of the subgenus *Anachyris*(Poaceae). Flora MorpholDistrib Functional Ecol Plants 203(7):535–547.

Hojsgaard, D., Klatt, S., Baier, R., Carman, J.G. &Hörandl, E. 2014. Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. Critical Reviews in Plant Sciences 33: 414-427.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York: McGraw Hiil Book, 1940.

Karami O, Aghavaisi B, Pour AM (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. J Chem Biol 2:177-190

Koltunow A.M., Johnson S.D., Bicknell R.A. (1998) Sexual and apomictic development in Hieracium. Sexual Plant Reproduction, 11:213–230.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 25
Mov. 2

Koltunow, A.M. &Grossniklaus, U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. Annual Review of Plant Biology 54: 547-574.

Koltunow, A.M. 1993. Apomixis: embryo sacs and embryo formed without meiosis or fertilization in ovules. Plant Cell 5(10): 1425-1437.

Le Roux, J. J., &Wieczorek, A. M. (2008). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the velvet tree, MiconiacalvescensDC.(Melastomataceae). Molecular ecologyresources, 8(5), 961-964.

Ma, G. H., Li, Y., Jiao, G. L., Fu, X. P., & Lin, Y. R. (2007). Direct somatic embryogenesis and adventitious shoot formation from immature axillary buds of Melastoma affine. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 82(3), 428-432.

Maia F.R., Varassin I.G., Goldenberg R. (2016) Apomixis does not affect visitation to flowers of Melastomataceae, but pollen sterility does. Plant Biology, 18, 132- 138.

Melo, G.F.A. & Machado, I.C.S. 1996. Biologia da reprodução de *Henrietteasuccosa*DC. (Melastomataceae). Revista Brasileira de Biologia 56(2): 383-389.

Mendes-Rodrigues C., Araújo F.P., Barbosa-Souza C., Barbosa-Souza V., Ranal M.A., Santana D.G., Oliveira P.E. (2010) Multipledormancyand maternal effecton Miconia ferruginata DC. (Melastomataceae) seedgermination, Serra de Caldas Novas, Goiás, Brazil. Revista Brasileira de Botânica, 33, 93–105.

Mendoza-Cifuentes, H. & Fernández-Alonso, J.L.. 2011. Análisiscladístico de *Centronia*(Merianieae, Melastomataceae) con base en caracteres morfológicos. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias 35 (137): 431-450.

Nei, M. 1972. Geneticdistancebetweenpopulations. American naturalist 106: 283-292.

Niemann J, Wojciechowski A, Janowicz J (2012) Identification of apomixis in the Kentucky bluegrass (Poa pratensis L.) using auxin test. Acta SocietatisBotanicorumPoloniae 81 (3):217- 221. doi:10.5586/asbp.2012.020

O'Brien TP, Feder N, Mccully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59(2): 368-373.

Peakall R., Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: geneticanalysis in Excel. Population genetic software forteaching and research – an update. Bioinformatics,28, 25372539.

Prichard J.K., Wen X., Falush D. (2010) Documentationfor STRUCTURE software: version 2.3. University ofChicago, Chicago, IL, USA, 38 pp.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 26
Mov. 2

Pupilli F, Barcaccia G (2012) Cloning plants by seeds: inheritance models and candidate genes to increase fundamental knowledge for engineering apomixis in sexual crops. J Biotechnol 159(4):291–311.

Renner, S.S. 1989. A survey of reproductive biology in neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden 76(2): 496-518.

Rose RJ, Mantiri FR, Kurdyukov S, Chen SK, Wang XD, Nolan KE, Sheahan MB (2010). Developmental Biology of Somatic Embryogenesis. Plant Dev Biol - Biotech Perspec, 2:3-26.

Sharbel, T. F., Voigt, M. L., Corral, J. M., Galla, G., Kumlehn, J., Klukas, C., ... & Rotter, B. (2010). Apomictic and sexual ovules of Boechera display heterochronic global gene expression patterns. The Plant Cell, 22(3), 655-671.

Sharma R, Geeta R, Bhat V (2014) Asynchronous male/female gametophyte development in facultative apomictic plants of *Cenchrusciliaris*(Poaceae). South African J Bot 91:19–31.

Silva, D.P.C. (2010). Dissertação de mestrado. Embriogênese somática e potencial uso de marcadores moleculares embriogênicos em Byrsonima intermedia A. Juss. (Murici-pequeno). Universidade Federal de Lavras.

Souza, M. L. D. R. &Baumgratz, J. F. A. 2009. *Leandra*Raddi. In. Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M. & Martins, S.E. eds. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, v.6, p. 32-68.

Subramanyam, K. 1944. A contribution to the life-history of Sonerilawallachii Benn. Proceedings of the Indian Academy Of Sciences 19: 115-120.

Tucker, M.R. &Koltunow, A.M.G. 2009. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships. Functional Plant Biology 36(6):490-504.

Whitton J, Dlugosch KM, Sears CJ (2008) Molecular and morphological evidence for and against gene flow in sympatric apomicts of the North American Crepis agamic complex (Asteraceae) this paper is one of a selection of papers published in the special issue on systematics research. Botany 86(8):877-885.

Yeh, F.C. Boyle, T.J. 1997. Population genetic analysis of co-dominat and dominat markers and quantitative traits. Belgian Journal of Botany 129: 157-163.

Zhang CX, Li Q, Kong L. (2007) Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana*Zucc. ex Endl.). Plant Cell Tiss Organ Cult 91:273–280.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.

PROTOCOLO INTEGRADO DO ESTADO
Fls. 27
Mov. 2

Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell, 5:1411–1423.

Inserido ao protocolo 16.294.728-1 por: Ariana Gabriele Veloso Mateus em: 19/12/2019 13:59.