



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

ANÁLISE E COMPARAÇÃO FILOGENÉTICA DE EXPANSINAS PRESENTES EM *Urochloa decumbens* cv *Basilisk*

Robison Yuzo Ono¹; Lucimara Chiari² Rodrigo Matheus Pereira³

UFGD/FCBA – Caixa Postal 533, 79.804-970, Dourados MS, E-mail: robison_jpono@hotmail.com;
rodrigopereira@ufgd.edu.br

1 Acadêmico do curso de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais; 2 Pesquisadora da EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, MS; 3 Orientador Docente na Graduação em Biotecnologia da FBCA-UFGD.

RESUMO

A *Urochloa decumbens* cv *Basilisk* é uma gramínea forrageira que tem grande importância na pecuária brasileira por ser amplamente utilizada na alimentação animal. Possui características vantajosas, como a formação de pastagens por sementes, adaptação às várias condições de solo e clima, alta qualidade nutricional, alta produção de matéria seca, crescimento bem distribuído durante a maior parte do ano, baixo custo e tolerância a altos níveis de alumínio.

Devido a sua importância e para aprofundar os conhecimentos a respeito desta planta, recentemente foi gerado um banco de sequências de genes expressos, transcriptoma, de *Urochloa decumbens*.

Um importante conjunto de proteínas que estão ligadas ao afrouxamento da parede celular, regulando a expansão e o crescimento da planta são as expansinas. As expansinas são divididas em quatro famílias: α -expansina (EXPA), β -expansina (EXPB), expansina tipo A (EXLA), e expansina tipo B (EXLB). Acredita-se que a α -expansina promove o movimento de separação das microfibrilas de celulose pelo processo de rastejo molecular, induzindo a dissociação local e o deslizamento de xiloglucanos. A β -expansina é teorizado um trabalho semelhante sobre um glicano diferente, possivelmente o xilano. Já a EXLA e EXLB são reconhecidas por suas sequências conservadas e suas funções permanecem desconhecidas.

O objetivo deste trabalho foi analisar 4 expansinas de *Urochloa decumbens*, verificando a similaridade e a homologia delas com as de outras plantas.

Através da comparação por alinhamento local entre as sequências, realizada pelo programa BLAST, foi possível verificar a similaridade destas 88 expansinas entre as 1912 sequências existentes no banco de dados genbank do NCBI. Para realizar essa análise de similaridade, todas as sequências de expansinas do NCBI foram usadas para montar um banco de dados no computador local e posteriormente realizar a comparação entre elas. Em seguida foi selecionada uma expansina de cada família, a CL2142.Contig3_All (EXLA), Unigene56935_All (EXLB), CL18540.Contig1_All (EXPA) e CL21623.Contig1_All (EXPB), que foram colocadas junto com as 10 sequências do banco de dados local mais similares a ela para realizar o trabalho.

Foi realizado um alinhamento global no programa clustalX e posteriormente árvores filogenéticas no programa MEGA 6 para verificar a homologia das sequências escolhidas com as sequências mais similares do banco de dados. O método de construção de árvore filogenética utilizado foi o de máxima parcimônia com o bootstrap de 1000. Esta análise permitiu gerar quatro árvores filogenéticas, onde foi possível observar a homologia entre as sequências estudadas.

Através das árvores filogenéticas observou-se que a sequência de EXPA possui maior homologia com a expansina da planta *Brachypodium distachyon*. A sequência EXPB mostrou estar mais proximamente relacionada com a expansina da planta *Zea mays*. A sequência EXLA possui maior homologia com a expansina da planta *Zea mays*. E a sequências EXLB mostrou estar mais proximamente relacionada com a expansina da planta *Oryza sativa*.

Este estudo permitiu obter informações inéditas sobre expansinas expressas em *Urochloa decumbens*.

PALAVRAS-CHAVE: TRANSCRIPTOMA, FILOGENIA, BIOINFORMÁTICA.

INTRODUÇÃO

As pastagens ocupam 35% da área territorial do centro-oeste, tendo a pecuária grande importância regional. O gênero *Urochloa* possui diferentes variedades forrageiras que foram responsáveis pela revolução das pastagens na pecuária nacional em 1970 (SEGATTO, R. A. et al.; 2014), incluindo *Urochloa decumbens* cv. Basilisk .

O capim, (*Urochloa decumbens*) cv. *Basilisk* possui ampla adaptação às várias condições de solo e clima, alta qualidade nutricional para a alimentação animal, alta produção de matéria seca, crescimento bem distribuído durante a maior parte do ano, baixo custo de produção e tolerância a altos níveis de alumínio em solos ácidos. O transcriptoma das raízes dessa forrageira foi recentemente sequenciado usando a técnica de RNA-Seq e um banco de dados de sequências expressas está disponível para estudos básicos nesta forrageira.

As expansinas são proteínas que estão presentes na parede celular das plantas, e estão envolvidas em diferentes processos de desenvolvimento da mesma. As expansinas foram identificadas em todas as plantas terrestres que foram examinadas. Trabalhos anteriores demonstraram que o tamanho da família das expansinas permanece relativamente constante entre as espécies, mesmo quando os genes individuais têm uma diferente história evolutiva (CAREY; HEPLER; COSGROVE, 2013).

As expansinas são um grupo de enzimas extracelulares que modificam diretamente as propriedades mecânicas da parede celular da planta, induzindo a extensão da parede celular, ou o afrouxamento da tensão em condições de pH ácido (BUDZINSKI, I. G. F.; LEITE, T. F.; TAKAHASHI, E. K.; PEREIRA, L. F. R.; VIEIRA, L. G. E., 2011 *apud* LI, et al., 2002 *apud* MCQUEEN-MANSON, et al., 1992).

Além dessas funções, podem estar associadas ao amolecimento do tecido das frutas, abscisão, germinação, resposta ao estresse, parasitismo, entre outros.

As expansinas são codificadas por uma superfamília de genes, e são divididas em quatro famílias: α -expansina (EXPAs), β -expansina (EXPBs), expansina tipo A (EXLA) e expansina tipo B (EXLB). As expansinas possuem em média 250 a 275 aminoácidos de comprimento, e contém dois domínios que são precedidos por um peptídeo de sinal com 20 a 30 aminoácidos de comprimento. O domínio I homólogo a família de glicosídeo hidrolase (45 proteínas), e o domínio II especula-se ser um domínio de ligação de polissacarídeos na superfície da proteína (ZHU, Y. et al., 2013).

Apenas as maiores famílias (EXPA e EXPB) estão relacionadas ao afrouxamento da parede celular, ao passo que as expansinas semelhantes (EXLA e EXLB) são reconhecidas apenas pelas suas sequências conservadas e as suas funções permanecem desconhecidas (SANTO, S. D. et al., 2013).

A parede celular da planta é composta de microfibras de celulose, que se liga a diferentes glicanos, incluindo o xiloglucano e a xilana (hemiceluloses). A extensão da parede celular envolve a separação dessas microfibras de celuloses das hemiceluloses pelo processo de deformação molecular, promovendo o deslizamento entre os polímeros e permitindo que a

célula absorva água, levando a expansão da parede celular. Existe uma hipótese que a expansina A promove este movimento induzindo a dissociação local e o deslizamento de xiloglucanos, enquanto que a expansina B trabalha de maneira semelhante sobre um glicano diferente, talvez sobre a xilana. No entanto, não existem ensaios que demonstre que as expansinas têm essa atividade hidrolítica ou qualquer outra atividade enzimática (ZHU, Y. et al., 2014).

BIOINFORMÁTICA

Bioinformática aplica as técnicas de informática em análise de dados biológicos, a utilização de suas ferramentas permite a realização de diversos estudos entre eles a construção de árvores filogenética, que representa a história evolutiva dos organismos nela incluídos (MATIOLI; FERNANDES, 2012). Devido ao aumento de informações nos bancos de dados e ao avanço dos recursos computacionais, há uma crescente disponibilidade de genomas completos sequenciados de organismos, inclusive de plantas.

BANCO DE DADOS

Uma ferramenta muito usada na bioinformática são os bancos de dados. Banco de dados pode ser considerado uma coleção de dados inter-relacionados, projetados para suprir as necessidades de um grupo específico de aplicações e usuários. Um banco de dados organiza e estrutura as informações de modo a facilitar consultas, atualizações e deleções de dados (PROSDOCIMI et al 2002). Sua função é estrutura e organizar as informações de forma que facilite consultas e atualizações de dados. A construção de bancos de dados para armazenamento de informações de sequências de DNA, proteínas e suas estruturas tridimensionais, bem como vários outros produtos da era genômica, tem sido extremamente importante e um grande desafio, principalmente devido a imensa quantidade de dados gerados em inúmeros laboratórios de todo o mundo (NAPOLI, 2003, apud BALDANI et al, 2011, p. 9). Um dos principais banco de dados sobre informações genômicas é o GenBank do Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA (NCBI), disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov.

O Genbank é parte da colaboração internacional de base de dados de sequências nucleotídicas (International Nucleotide Sequence database collaboration) que é composto pelo banco de dados de DNA do Japão (DNA Databank of Japan - DDBJ), o Laboratório de Biologia Molecular Europeu (European Molecular Biology Laboratory - EMBL) e o Genbank

no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Estas três organizações trocam informações entre si e o Genbank que é atualizado a cada dois meses (NCBI-Genbnak, 2010, apud SOUZA, 2011, p. 25).

Uma prática de grande importância e muito utilizada são as comparações entre sequências para identificação das mesmas. Existem diferentes meios e ferramentas para realizar essa comparação, porém uma das mais frequentemente usadas é o alinhamento local entre sequências, realizado pelo programa BLAST.

BLAST

Para que se busquem as sequências em bancos de dados, é necessário utilizar uma ferramenta que reconheça as sequências mais similares para facilitar a comparação e o alinhamento entre elas (MATIOLI, 2001; SCHNEIDER, 2003). O programa BLAST (Basic Local Aligement Search Tool) procura regiões de similaridade local entre as sequências.

O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas no banco de dados e calcula a significância estatística da diferença entre elas. O BLAST pode ser utilizado para inferir relações evolutivas e funcionais e também identificar membros de famílias gênicas (NCBI-BLAST, 2010).

O algoritmo BLAST foi desenvolvido, na década de 1980, nos EUA (ALTSCHUL et al., 1990 apud EMBRAPA, 2007). Este algoritmo prioriza alinhamentos de locais específicos da sequência, com respaldo estatístico, em lugar de realizar alinhamento global, como os realizados por programas de alinhamento de múltiplas sequências como o Clustal (CHENNA et al.; 2003 apud EMBRAPA, 2007). Com isto, o programa é capaz de identificar relação entre sequências que compartilham similaridade, mesmo que esta ocorra somente em algumas regiões isoladas (ALTSCHUL et al., 1990 apud EMBRAPA, 2007). Tal fato indica que se o recurso utilizado pelo programa fosse o alinhamento global, ou seja, com o uso imediato do comprimento total da sequência, menor número de similaridades seriam encontradas, sobretudo no caso de domínios e motivos.

Outra análise muito usada em bioinformática é a filogenia. O conceito de filogenia surgiu com Darwin, junto com o próprio conceito de ancestralidade entre espécies, que foi representado por meio de uma árvore, que indica supostas relações de ancestralidade entre as espécies (SOUZA, 2011).

Uma árvore é uma representação de uma hipótese utilizada como modelo da mais provável história evolutiva de um grupo de sequências ou de organismos. Uma árvore

consiste de nós conectados por braços. Nós terminais representam sequências ou organismos que estão sendo estudados. Nós internos representam os hipotéticos ancestrais. O ancestral de todas as sequências da árvore é a raiz desta (Page & Holmes, 1998; Yang, 2006, apud SOUZA, 2011, p. 21).

Para se trabalhar com reconstrução filogenética baseada em dados moleculares é preciso conhecer algumas propriedades das sequências a serem comparadas. Primeiramente, elas têm de ser homólogas, ou seja, apresentar ancestralidade em comum. Há três tipos de homologia: ortologia, quando as sequências têm um único e mesmo ancestral comum; paralogia, quando se originam de uma duplicação gênica; e xenologia, quando se originam por incursão lateral (ou horizontal). Apenas sequências ortólogas poderão fornecer informações filogenéticas na história de organismos (FERNANDES & MATIOLI, 2001, p. 37-38).

Existem diferentes métodos de construção de árvores filogenéticas e dependendo dos dados biológicos usados será escolhido pelo orientador o método de construção que for mais adequado para seu conjunto de dados. A máxima parcimônia é um método de construção que objetiva encontrar a topologia da árvore para um grupo de sequências que possa ser explicada com o menor número de mudanças de caracteres (mutações). O algoritmo da MP calcula a probabilidade da esperança de cada nucleotídeo (ou aminoácido) no nó ancestral (interno) e infere a chance da ocorrência de cada topologia para aquela probabilidade. Trata-se de um processo complexo, principalmente porque diferentes topologias de árvores requerem diferentes tratamentos matemáticos, o que demanda atividade computacional elevada (PINTO, 2004).

Nesse método, nem toda variabilidade das sequências é útil porque aquelas que apresentarem variação numa única sequência adicionarão um passo para qualquer uma das árvores consideradas, ou seja, aquela que tiver o menor número de mudanças. Em seguida, para cada uma das árvores possíveis, o número de substituições de cada sítio informativo é inferido e o total, para cada uma das árvores possíveis é calculado. A árvore com menor comprimento é selecionada como mais parcimoniosa. Pode haver mais de uma árvore parcimoniosa e todas devem ser consideradas (Matioli, 2001, apud SOUZA, 2011, p. 23).

O método da parcimônia apresenta como vantagem a fácil interpretação dos dados, uma vez que escolhe o caminho mais simples. A desvantagem ocorre quando os marcadores usados apresentam grande número de homoplasias relativamente à quantidade de sítios informativos. As sequências com muitas substituições apresentarão ramos longos comparativamente aquelas com menores números de substituições. Estas então serão

agrupadas erroneamente pelo método da parcimônia. Este problema é denominado atração de ramo longo. Ele pode ser contornado com o uso de marcadores com menores taxas de evolução (Page & Holmes, 1998; Yang, 2006, apud SOUZA, 2011, p. 23).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi analisar 4 expansinas de *Urochloa decumbens*, verificando a similaridade e a homologia delas com as de outras plantas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O transcriptoma de raízes de *Urochloa decumbens* cv *Basilisk* foi obtido pela Embrapa Gado e Corte em Campo Grande – MS, segundo Oliveira et al. (2013). Os transcritos obtidos foram disponibilizados para realização do presente estudo.

Para realização das análises de expansinas em *U. decumbens*, inicialmente buscou-se todas as sequências de expansinas existentes no Genbank, banco de dados online do NCBI (Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov) para realização da comparação. Todas as sequências de nucleotídeos foram copiadas no formato FASTA. Em seguida um banco de dados local foi criado em um computador da FCBA (Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais). Foi possível encontrar 88 expansinas sequenciadas no transcriptoma de *Urochloa decumbens*. Dessas 88 foi selecionado 1 expansina de cada família para verificar a similaridade com as sequências do banco de dados através do BLAST observando as que eram mais similares as sequências escolhidas.

Após selecionar 1 sequência de cada expansina e as sequências do NCBI mais similares a elas, realizou-se um alinhamento global dessas sequências com o programa ClustalX. Em seguida o alinhamento foi convertido para o formato MEGA. Uma árvore filogenética foi construída no programa MEGA utilizando o método de máxima parcimônia com bootstrap igual a 1000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o arquivo gerado pelo BLAST, foram encontradas 36 sequências similares com as 4 sequências de expansinas expressas pela *Urochloa decumbens* selecionadas, sendo que, 6 sequências similares a EXLA, 10 sequências similares a EXLB, 10 sequências similares a EXPA e 10 sequências similares a EXPB.

SEQUÊNCIA ANALISADA	SEQUÊNCIAS SIMILARES	SCORE	E-VALUE
---------------------	----------------------	-------	---------

CL2142.Contig3_All (EXLA)	gi 226491413 <i>Zea mays</i>	557	e-159
	gi 573960760 <i>Oryza brachyantha</i>	373	e-103
	gi 25136296 <i>Oryza sativa</i>	147	1,00E-35
	gi 21654742 <i>Oryza sativa</i>	147	1,00E-35
	gi 514768451 <i>Setaria italica</i>	58	1,00E-08
	gi 195641549 <i>Zea mays</i>	52	6,00E-07

Unigene56935_All (EXLB)	gi 514733819 <i>Setaria italica</i>	648	0
	gi 357122742 <i>Brachypodium distachyon</i>	248	2,00E-66
	gi 28194058 <i>Oryza sativa</i>	143	9,00E-35
	gi 225466784 <i>Vitis vinifera</i>	58	4,00E-09
	gi 35949754 <i>Vitis vinifera</i> /	58	4,00E-09
	gi 357165151 <i>Brachypodium distachyon</i> /	56	2,00E-08
	gi 449461306 <i>Cucumis sativus</i>	54	6,00E-08
	gi 449517839 <i>Cucumis sativus</i>	54	6,00E-08
	gi 565386938 <i>Solanum tuberosum</i> /	54	6,00E-08
	gi 359496363 <i>Vitis vinifera</i>	50	1,00E-06

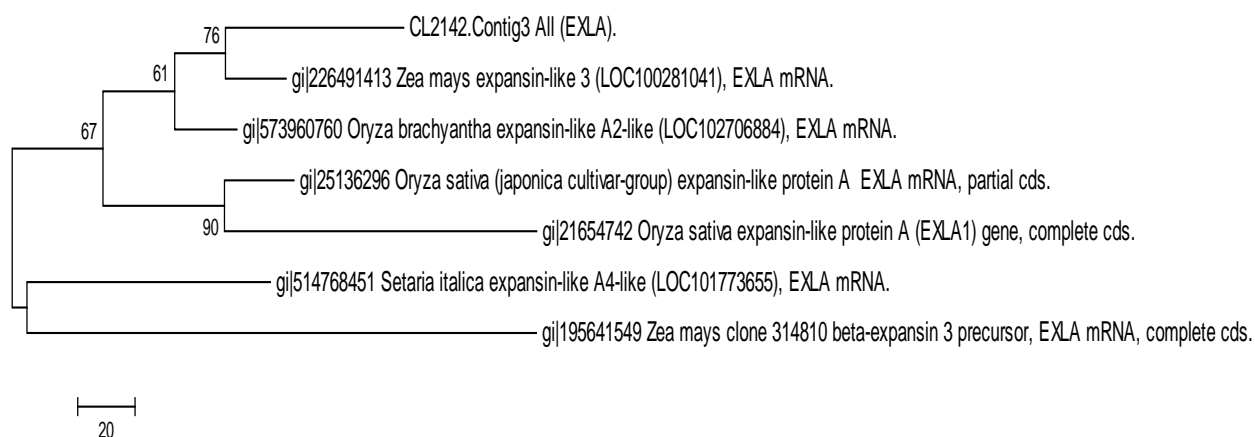
CL18540.Contig1_All (EXPA)	gi 357129412 <i>Brachypodium distachyon</i>	90	6,00E-19
	gi 37999972 <i>Musa acuminata</i>	72	1,00E-13
	gi 124366369 <i>Musa acuminata</i>	72	1,00E-13
	gi 9967925 <i>Festuca pratensis</i>	70	5,00E-13
	gi 1041711 <i>Oryza sativa</i>	68	2,00E-12
	gi 44894783 <i>Triticum aestivum</i>	58	2,00E-09
	gi 67037294 <i>Oryza sativa</i>	50	5,00E-07
	gi 357120703 <i>Brachypodium</i>	50	5,00E-07

	<i>distachyon</i>		
	<i>gi/359492105 Vitis vinifera</i>	50	5,00E-07
	<i>gi/514821962 Setaria italica</i>	50	5,00E-07

CL21623.Contig1_All (EXPB)	<i>gi/14193774 Zea mays</i>	997	0
	<i>gi/8118424 Oryza sativa</i>	831	0
	<i>gi/14193762 Zea mays</i>	831	0
	<i>gi/44894797 Triticum aestivum</i>	692	0
	<i>gi/573959716 Oryza brachyantha</i>	430	e-121
	<i>gi/357147366 Brachypodium distachyon</i>	428	e-120
	<i>gi/50882028 Triticum aestivum</i>	410	e-115
	<i>gi/51242710 Triticum aestivum</i>	381	e-106
	<i>gi/8118429 Oryza sativa</i>	375	e-104
	<i>gi/44894795 Triticum aestivum</i>	373	e-103

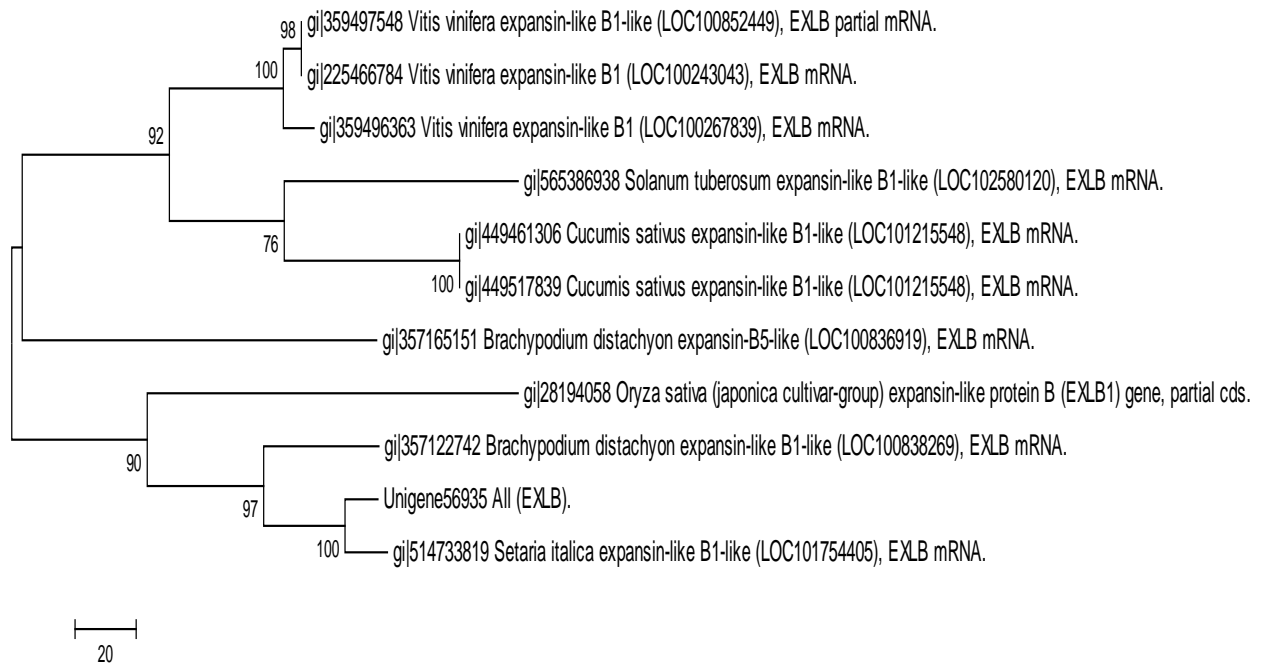
A expansina CL2142.Contig3 All (EXLA) da *Urochloa decumbens* apresentou maior homologia com o *Zea mays* clone 314810 beta-expansin 3 precursor, mRNA, complete cds. Esse resultado pode ser observado na árvore filogenética abaixo.

Figura 1: Sequência CL2142.Contig3 All (EXLA)



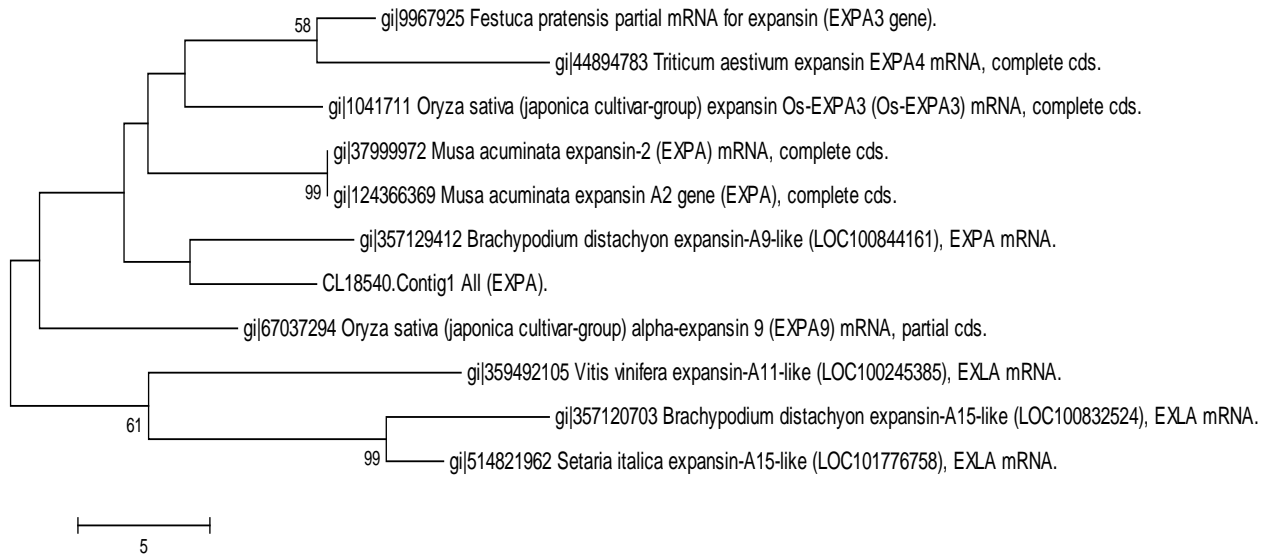
A expansina Unigene56935 All (EXLB) da *Urochloa decumbens* apresentou maior homologia com a *Setaria Italica* expansin-like protein B (EXLB1) gene, partial cds.

Figura 2: Sequência Unigene56935 All (EXLB)



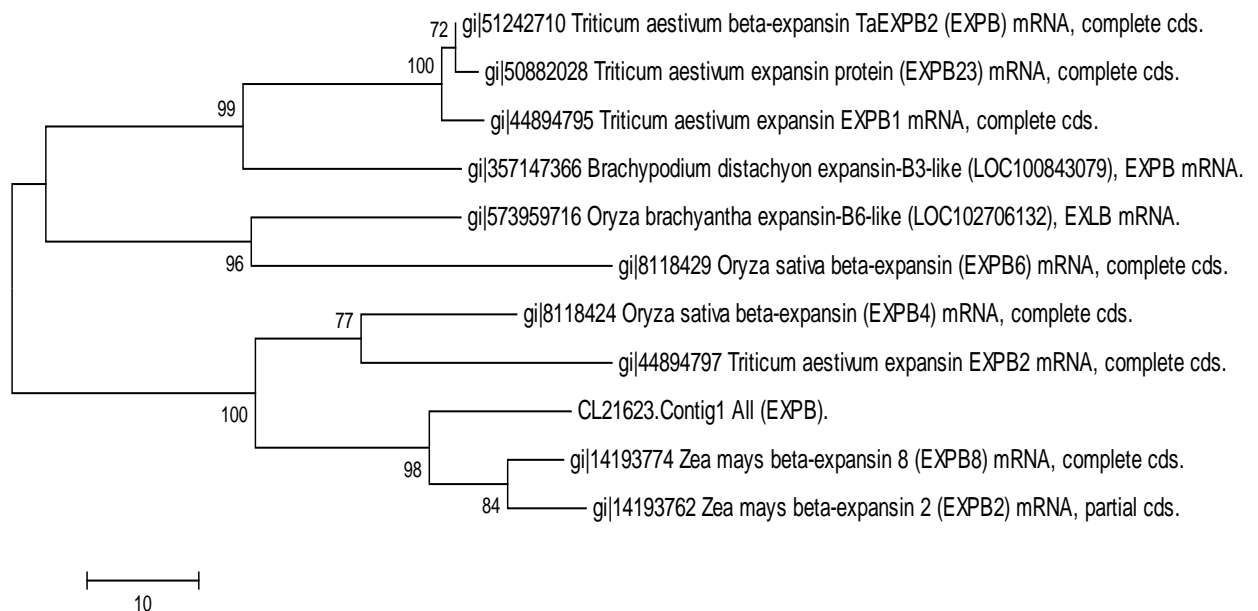
A expansina CL18540.Contig1 All (EXPA) da *Urochloa decumbens* apresentou maior homologia com a *Brachypodium distachyon* expansin-A9-like (LOC100844161), mRNA.

Figura 3: CL18540.Contig1 All (EXPA)



A expansina CL21623.Contig1 All (EXPB) da *Urochloa decumbens* apresentou homologia com várias sequências, retornando um elevado valor de bootstrp, 98% com um grupo formado por *Zea mays* beta-expansin 8 (expB8) mRNA, complete cds e *Zea mays* beta-expansin 2 (expB2) mRNA, partial cds.

Figura 4: CL21623.Contig1 All (EXPB)



CONSIDERAÇÕES FINAIS

As 4 seqüências de expansinas escolhidas CL21623.Contig1 All, CL18540.Contig1 All, Unigene56935 All, CL2142.Contig3 All apresentaram similaridades elevadas com *gi/226491413 Zea mays*, *gi/514733819 Setaria itálica*, *gi/357129412 Brachypodium distachyon*, *gi/14193774 Zea mays*, respectivamente. A análise filogenética confirmou a homologia existente entre as sequências anteriormente analisadas exibindo graficamente o relacionamento delas com as expansinas de outras plantas.

Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que a construção das árvores filogenéticas pelo método de máxima parcimônia foi à escolha mais adequada, pois, nas árvores obtidas por outros métodos de construção os valores de bootstrap eram muito baixos indicando problemas na filogenia. Em todas as árvores houve homologia entre as sequências, demonstrando que há uma ancestralidade entre os diferentes tipos de expansinas sequenciados na *Urochloa decumbens* e as sequências depositadas no banco de dados online do NCBI.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA Gado de Corte por realizar o transcriptoma de *U. decumbens*. Aos órgãos financiadores: FUNDECT, CAPES, CNPq, UNIPASTO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, J. I. et al. Bases de dados genômica de estirpes que compõem o inoculante de cana-de-açúcar e milho. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agrobiologia, Seropédica. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105210/1/DOC282-11.pdf>>. Acesso em: 2 de jul. 2014.

BUDZINSKI, I. G. F.; LEITE, T. F.; TAKAHASHI, E. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Coffea Expansin Gene Family and Expansin Expression during Fruit Maturation. Brasil.

CAREY, R.; HEPLER, N.K.; COSGROVE D.J. Selaginella moellendorffi has a reduced and highly conserved expansin superfamily with genes more closely related to angiosperms than to bryophytes. BMC Plant Biology, abril 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/4>>. Acesso em: 28 de maio 2014.

CHOI, D.; CHO, H.T.; LEE, Y. Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum*, 126, 2006.

EMBRAPA. O programa BLAST: guia prático de utilização. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/clp/publicacoes/doc/2007/doc224.pdf>>. Acesso em: 3 de jul. 2014.

FERNANDES, F. M. C. & MATIOLI. NOÇÕES DE FILOGENÉTICA MOLECULAR. São Paulo. Depto. de Biologia, Instituto de Biociências, USP. v.63, n.1/2, p.37-38, jan./dez., 2001.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M.C. Reconstrução filogenética: introdução e o método de máxima parcimônia. *Biologia Molecular e Evolução* 2ª edição. Ribeirão Preto: Holoseditora, 2012. p. 113 – 122.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M.C. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. *Biologia Molecular e Evolução* 2ª edição. Ribeirão Preto: Holoseditora, 2012. p. 123 - 131.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M.C. Reconstrução filogenética: métodos probabilísticos. *Biologia Molecular e Evolução* 2ª edição. Ribeirão Preto: Holoseditora, 2012. p. 133 – 145.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M.C. Reconstrução filogenética: inferência bayesiana. *Biologia Molecular e Evolução* 2ª edição. Ribeirão Preto: Holoseditora, 2012. p. 147 - 156.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M.C. Como escolher genes para problemas filogenéticos. *Biologia Molecular e Evolução* 2ª edição. Ribeirão Preto: Holoseditora, 2012. p. 157 - 164.

OLIVEIRA, K. M. B.; CHIARI, L.; BARRIOS, S. C. L.; LAURA, V. A. Avaliação de Híbridos Intraespecíficos de *Bracharia decumbens* Stapf (Poaceae) para Tolerância ao Alumínio. **EMBRAPA, I Workshop sobre Tolerância a Estresses Abióticos**. Campo Grande, MS, p.16-25, 2013.

PEREIRA, J. R.; CAMPOS, A. T. Controle da braquiária como invasora. Embrapa, outubro 2001. Disponível em:

<www.cnpqgl.embrapa.br/totem/conteudo/Forrageiras_e_pastagens/Pasta_do_Produtor/26_Controla_da_brachiaria_como_invasora.pdf> acesso em: 25 de maio 2014

PINTO, J. F. C. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA DO TIPO I: MÉTODOS DE INFERÊNCIA FILOGENÉTICA. 2004. 69f. Tese (Mestrado em Saúde Pública) - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA, Rio de Janeiro. 2004.

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E.; SILVA, A. F.; REIS, A. N. dos; JUNQUEIRA, A. C.; SANTOS, A. C. F. dos; NBANI JÚNIOR, A.; WUST, C. I.; CAMARGO FILHO, F.; KESSEDIAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. de G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. de S.; FLATSCHART, A. V. F. Bioinformática: manual do usuário. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 5, n. 29, nov.;dez.; 2002.

SANTO, S. D. et al. Genome-Wide Analysis of the Expansin Gene Superfamily Reveals Grapevine-Specific Structural and Functional Characteristics. Department of Biotechnology, University of Verona, Verona, Italy, abril de 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0062206#abstract0>>. Acesso em: 2 de jul. 2014.

SEGATO, R. A.; SATO GUIMA, S. E.; SHIRAKAWA, K. T.; PEREIRA, R. M.; CHIARI, L. Genes de resistência a doenças em *Urochloa decubens* cv. Basilisk. UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS, Dourados, 2014.

SOUZA, J. F. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GRUPO PANARTHROPODA AVALIADAS ATRAVÉS DE SEQUÊNCIAS DO GENE rDNA 18s. 2001. 47f. Tese (Mestrado em Genética) - INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte. 2011.

WOLF, S.; HÉMATY, K.; HOFTE, H. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. Institut Jean-Pierre Bourgin, Paris, janeiro 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-arplant-042811->

105449?prevSearch=all%253A%2528Growth%2BControl%2Band%2BCell%2BWall%2BSignaling%2Bin%2BPlants%2529&searchHistoryKey=>. Acesso em: 28 de jun. 2014.

ZHU, Y.; WU, N.; SONG, W.; YIN, G.; YAN, Y.; HU, Y. Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies. College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China, abril de 2014. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/14/93>. Acesso em: 2 de jul. 2014.