

Análise por qRT-PCR da Expressão de Dois Genes do Tipo MADS-Box em *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf

Larissa Arrais Guimarães¹, Érica Duarte Silveira², Vera Tavares de Campos Carneiro³

Introdução

O gênero *Brachiaria* apresenta espécies com plantas de modo de reprodução sexual e apomítico. A apomixia é o modo de reprodução assexual por meio de sementes, em que o saco embrionário é formado de uma célula não reduzida. O desenvolvimento do embrião se dá de modo autônomo, ou seja, sem fertilização da oosfera [1].

Genes tipo MADS-Box são fatores de transcrição e estão relacionados com o desenvolvimento de órgãos florais de plantas [2]. A caracterização desses genes homeóticos em *Brachiaria brizantha* é, portanto, importante para o entendimento dos processos envolvidos na diferenciação dos órgãos reprodutivos nos diferentes tipos de reprodução. O objetivo deste trabalho é analisar o perfil de expressão de genes da família MADS-box identificados em bibliotecas de cDNA de ovários de *B. brizantha*, visando relacionar a atuação destes genes com a sexualidade e a apomixia que é encontrada em mais de 300 espécies de angiospermas.

Material e Métodos

A. Material Vegetal

Todo material utilizado para análises foi coletado no campo e na casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As folhas, raízes, anteras e ovários foram extraídos de BRA 00591- B30, *B. brizantha* tetraplóide apomítica, e BRA 002747- B105, sexual diplóide. Para reação de qRT-PCR foram utilizados cDNAs sintetizados a partir de RNA total de folha, flor e ovário de B30 e B105. A extração do RNA total de folha e raiz foi realizada pelo método NTES e o método de extração por Trizol (Gibco™) foi utilizado para extração de RNA total de flor, ovário e antera. O RNA total foi tratado com DNase (Amersham™) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose. O RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™). Somente as amostras de RNA com razão 260/280 entre 1,9 e 2,1 foram utilizadas para síntese da fita simples de cDNA.

Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa de no mínimo 2 µg de RNA total em um volume final de 20 µL utilizando a enzima Superscript II (Invitrogen™).

B. PCR em tempo real (qRT-PCR)

Foram selecionadas duas seqüências gênicas (contig 38 e contig 119) do tipo MADS-Box, obtidas em bibliotecas de cDNA de ovários em megasporogênese e megagametogênese de plantas apomíticas e sexuais previamente construídas. Seqüências gênicas de ubiquitina (UBCE e UBIE2) obtidas nas mesmas bibliotecas foram usadas como genes de referência para a normalização dos resultados.

A reação de qRT-PCR foi feita em um volume final de 20 µL, utilizando 0,1 µL de cDNA fita simples. Para cada reação foi utilizado Tampão PCR (Invitrogen™) 1X concentrado, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 0,1 mM, 0,25 U Taq Platinum (Invitrogen™), SYBR Green (Amersham™) 0,1X concentrado, 0,2 µM de cada iniciador.

As reações foram feitas sob as seguintes condições, usando Chromo4 Real Time PCR Detector (BioRad™): 5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 10 segundos a 60°C, 15 segundos a 72°C, 35 segundos a 60°C. A curva de dissociação foi feita de 30°C a 100°C, com leitura a cada 1°C. Os dados gerados a partir do software Opticon 3, utilizado para leitura de fluorescência, foram colocados em planilha MS Excel (Microsoft, Redmond, WA) e analisados no aplicativo visual basic do MS Excel qBase versão 1.3.4 [3].

Resultados e Discussão

Análises de qRT-PCR dos contigs 38 e 119 mostraram expressão preferencial em ovários de plantas apomíticas e sexuais. O contig 119 apresentou, na planta apomítica, expressão significativamente maior em ovário no estágio III (início da megagametogênese) e na planta sexual, em ovário estágio II (final da megasporogênese) e estágio III (início da megagametogênese).

O interesse na avaliação da função dessas seqüências é ainda maior visto que os resultados obtidos em qRT-PCR

1. Larissa Arrais Guimarães é aluna de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF. E-mail: larissaarrais@yahoo.com.br

2. Érica Duarte Silveira é aluna de doutorado, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: ericads@cenargen.embrapa.br

3. Vera Tavares de Campos Carneiro é pesquisadora, Laboratório de Reprodução Vegetal, Brasília, DF. E-mail: vera@cenargen.embrapa.br
Apoio financeiro: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e CBAB MCT- CNPq.

indicam possível modulação de expressão desses genes em plantas sexuais e apomíticas. O nível de amplificação do contig 119 foi bastante reduzido em plantas apomíticas em estágios de desenvolvimento dos ovários similares àqueles de plantas sexuais. Além disso, os resultados indicam que na planta apomítica a expressão desse gene é tardia em relação à planta sexual. Estes resultados podem significar que esteja ocorrendo uma repressão da expressão do contig 119 no início da megasporogênese de plantas apomíticas, onde estão relatados eventos diferenciais de desenvolvimento celular, como a interrupção da meiose ou degeneração da tétrade e a diferenciação de iniciais apospóricas [4] e [5]. Experimentos de hibridização *in situ* estão sendo realizados para determinação do papel desses genes na formação dos óvulos e flores de *B. brizantha* e da eventual relação com o processo de diferenciação de sacos embrionários de plantas apomíticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Marcio Alves-Ferreira que disponibilizou o aparelho Chromo4 Real Time PCR Detector (BioRad™) do laboratório de Genética Molecular Vegetal (Departamento de Genética) da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ para realização destes experimentos.

Referências

- [1] NOGLER, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B. M. (Ed.). Embriology of angiosperms. Berlin: Springer-Verlag, p. 475-518.
- [2] ZSUZSANNA SCHWARZ-SOMMER, P. H., WOLFGANG NACKEN, HEINZ SAEDLER, HANS SOMMER. 1990. Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. Science, New Series, , v.250, n. 4983, p.931-936 .
- [3] Relative quantification software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data (Online). Homepage: <http://medgen.ugent.be/qbase/>
- [4] ARAÚJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, 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, v. 23, n. 1-2, p. 13-28.
- [5] DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. 1999. Activity and localisation of sucrose synthase and invertase in ovules of sexual and apomictic *Brachiaria decumbens*. Protoplasma, v. 208, p. 173-185.

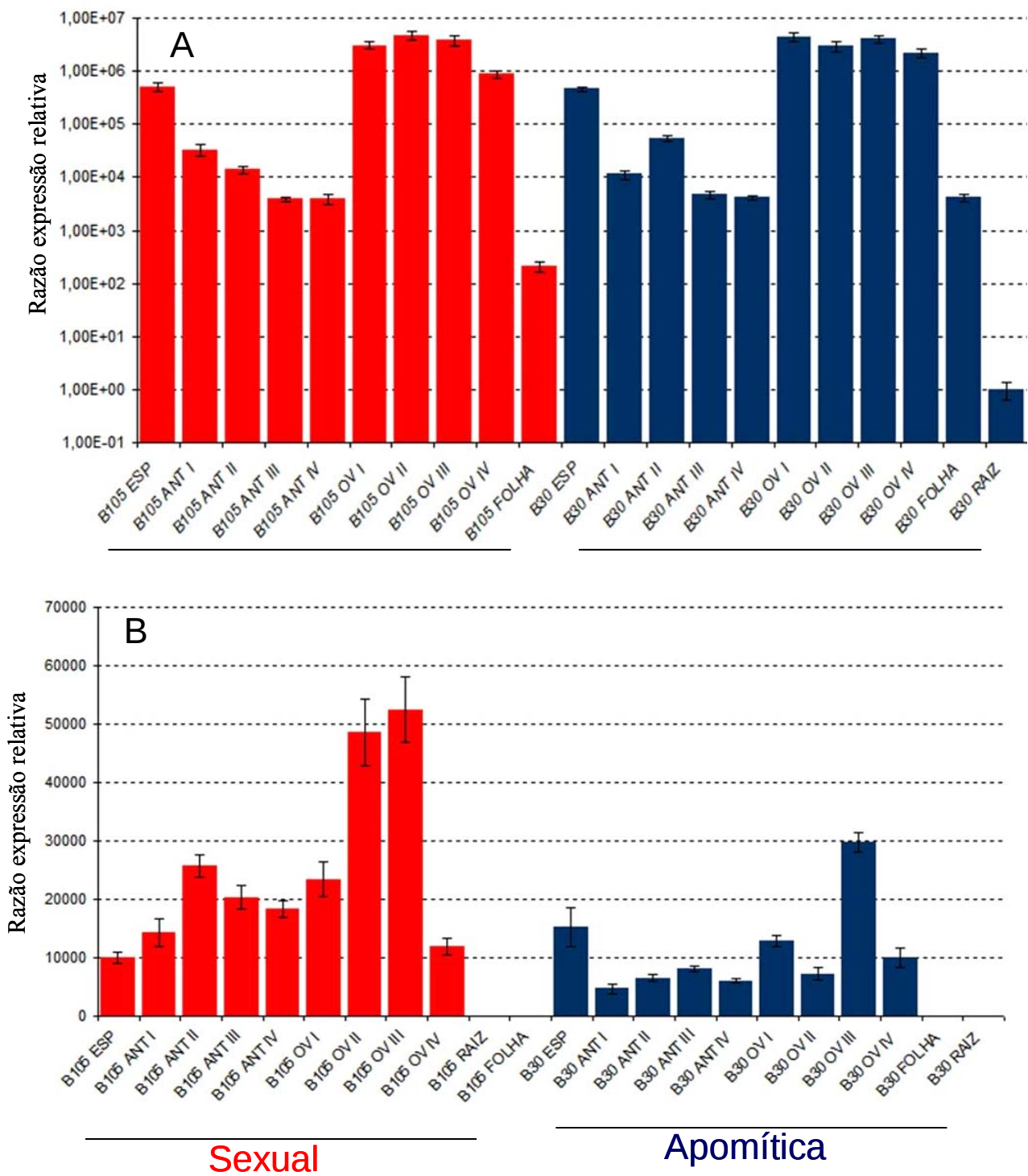


Figura 1. PCR em tempo real (qRT-PCR) monitorando a expressão do contig 38 (A) e 119 (B) em espigueta (ESP); antera (ANT); ovário (OV), nos estágios de megasporogênese (I e II) e megagametogênese (III e IV) em plantas sexuais (B105) e apomíticas (B30) de *Brachiaria brizantha*.