

Caracterização de cDNA de Ovários de *Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf

Ana Luiza Machado Lacerda¹, Glaucia Barbosa Cabral² e Vera Tavares de Campos Carneiro³

Introdução

Brachiaria é largamente utilizada no Brasil como forrageira tropical, sendo cultivada em uma área com extensão 100 milhões de hectares [1]. Esta gramínea apresenta plantas de modo de reprodução sexual e apomítico [2], sendo a apomixia predominante, principalmente, nas variedades comerciais [3].

Promotores de expressão específica em ovários de *Brachiaria* são de grande importância em estudos de expressão dos genes envolvidos na apomixia. Podem permitir análises de super-expressão desses genes em tecidos específicos como também o seu silenciamento para estudo de função. A identificação de seqüências de cDNA específicas de ovário pode contribuir na busca de suas regiões promotoras em bibliotecas genômicas. Em *B. brizantha*, Rodrigues *et al.* [4] isolaram nove fragmentos de cDNA de acesso apomítico e dois de acesso sexual diferencialmente expressos em ovários de *B. brizantha* apomítica e sexual, nos estágios de megasporogênese e megagametogênese. O objetivo deste trabalho foi determinar a órgão-especificidade de cDNA de expressão detectada previamente em ovários.

Material e métodos

A. Material Vegetal

Ovários, folhas e anteras foram coletados de plantas de *B. brizantha* cv. Marandu (apomítica) para extração de RNA. Os ovários e anteras foram extraídos no estágio de desenvolvimento relativo a megagametogênese, estágio IV, como descrito por Araújo *et al* [5].

B. Northern reverso

Dezoito clones diferenciais oriundos de DDPCR [4] foram selecionados e transferidos, na concentração de 250 ng, para membrana de náilon HybondTM-N com o auxílio de aparelho Bio-Dot[®] Microfiltration Apparatus (BIO-RAD). Outras membranas foram preparadas com seqüências de cDNA de seis clones, amplificadas em reação de PCR. Os géis foram transferidos para membranas de náilon HybondTM-N por capilaridade. Para confecção das três sondas o RNA total de ovário, folha e antera foram utilizados na síntese de cDNA marcado com [α^{32} P] dCTP. As membranas foram expostas a filmes de raios-X por 20 dias a -80°C.

C. Análise das seqüências

A análise das seqüências geradas no seqüenciador ABI3700 foi feita no endereço eletrônico <http://adenina.biomol.unb.br/phph>, utilizando o programa Electropherogram quality analysis [6]. O programa PHRED [7] foi utilizado para analisar a qualidade dos cromatogramas gerados no seqüenciador. A seqüência do vetor pCR[®] 2.1 e dos adaptadores do Kit de 5' RACE forma removidas com o programa CROSSMATCH. Para o agrupamento de seqüências foi utilizado o programa CAP3. Para análise de similaridade foi utilizado o programa BLASTN contra o banco nr (não redundante) de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) [8].

Resultados

A. Seleção de cDNA de expressão em ovário

No *northern* reverso em dot blot de DNA plasmidial, foram obtidos sinais de marcação: fraca para os clones 04, 09 e 21 e forte para o clone 45 contra cDNA de antera (Figura 1A); exclusiva para o clone 45 contra cDNA de folha (Figura 1B) e forte para os clones 04, 09, 21 e 45 contra cDNA de ovário (Figura 1C). No *northern* reverso com produto de amplificação por PCR, cDNA de seis clones foram amplificados e as bandas transferidas para membrana por capilaridade (Figura 2A). Os clones 09 e 21 hibridizaram com as sondas de cDNA de antera e de ovário (Figuras 2B e 2D), não apresentando marcação com a sonda de cDNA de folha (Figura 2C).

B. Análise das seqüências dos clones 09 e 21

As seqüências dos clones 09 e 21 foram comparadas em banco de dados (Blastn). A seqüência do clone 09 mostrou similaridade com seqüências de proteína ribossomal S8 de *Zea mays* e *Oryza sativa* (88% e 86%). A seqüência do clone 21 mostrou similaridade com proteína ribossomal L41 de *Hordeum vulgare* e *Nicotiana tabacum* (92% e 93%) (Tabela 1).

As seqüências dos clones 09 e 21 foram comparadas com seqüências das bibliotecas de cDNA de *B. brizantha* apomítica (B30) e sexual (B105) e o clone 09 mostrou similaridade com o *contig* 39 composto por hits das bibliotecas de B30 estágio I e II e B105 estágio IV. Já o

1. Ana Luiza Machado Lacerda é Bolsista DTI/CNPq, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília,DF, CEP 70770-900. E-mail: analacerda@cenargen.embrapa.br

2. Glaucia Barbosa Cabral é Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília,DF, CEP 70770-900. E-mail: gbcabral@cenargen.embrapa.br

3. Vera Tavares de Campos Carneiro é Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília,DF, CEP 70770-900. E-mail: vera@cenargen.embrapa.br

clone 21 mostrou similaridade com os *contigs* 34 e 67, ambos vindos de biblioteca de B30 I e II.

Discussão

Das seqüências de cDNA isoladas de ovários de *B. brizantha* por Differential Display-RT PCR - DDPCR, os clones, 04, 09, 21 e 45 apresentavam expressão tanto em ovários de plantas apomíticas quanto de plantas sexuais, na megasporogênese e megagametogênese. Entre estes, a expressão generalizada do clone 21 em ovários de plantas sexuais e apomíticas foi confirmada por *northern* reverso [4].

Dado o interesse de se isolar seqüências de cDNA de expressão restrita a ovários visando posterior identificação de promotores, buscou-se caracterizar a tecido-especificidade destes clones. As análises por *northern* reverso com cDNA de anteras, folhas e ovários mostraram a expressão dos clones 04, 09 e 21 apenas em anteras e ovários, já o clone 45 mostrou expressão também em folhas. Expressão dos clones 04, 09 e 21 foi revelada por dot-blot. Pela intensidade de hibridização dos clones 09 e 21 nos tecidos reprodutivos de *B. brizantha* apomítica e sexual, estes foram escolhidos para caracterização por sequenciamento e busca de função em bancos de dados.

A seqüência de aminoácido deduzida do clone 09 apresentou similaridade com o *contig* 39 da biblioteca de *B. brizantha* apomítica e sexual e ambas seqüências mostraram similaridade com a proteína ribossomal S8, que parece estar ligada à regulação da síntese de proteínas em células eucariotas [9]. Em *E.coli* a S8 é uma proteína ribossomal regulatória da tradução de proteínas ribossomais codificadas no operon *spc* [10].

A seqüência de aminoácido deduzida do clone 21 apresentou similaridade com os *contigs* 34 e 67 da biblioteca de *B. brizantha* apomítica. O clone 21 apresentou similaridade com a proteína ribossomal L41. A proteína ribossomal L41 quando está envolvida na síntese e processamento de proteínas em *Hordeum vulgare* [11] e em *Gossypium hirsutum* pode ter papel estrutural nos ribossomos [12].

As proteínas com as quais foi apontada similaridade em banco de dados, são proteínas envolvidas com síntese, processamento e regulação da tradução de proteínas ribossomais. A presença delas em ovários e anteras de *Brachiaria* tanto em acesso sexual como em apomítico, pode indicar um provável envolvimento na reprodução. Deverão ser realizados experimentos de RT-PCR para análise semi-quantitativa dessas seqüências em diferentes tecidos e órgãos de *B. brizantha*.

Referências

- [1] MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. D. 1996. *Brachiaria*: Biology, Agronomy and Improvement. Cali, Colombia: CIAT, v. 1. 258 p.
- [2] VALLE, C. B. D.; SAVIDAN, Y. 1996. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: J. W. Miles, B. L.

Maass, et al (Ed.). *Brachiaria*: Biology, agronomy and improvement. Cali- Colombia: CIAT-EMBRAPA, p. 147-163.

- [3] DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. 1999. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf.: gametophytic development and reproductive calendar. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, v. 41, p. 151-162.
- [4] RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M. A.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D.; CARNEIRO, V. T. C. 2003. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. *Plant Molecular Biology*, v. 53, 2004, p. 745-757.
- [5] ARAUJO, 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 Végétales - Le Botaniste Tome*, v.XXIII, n.1-2, p.13-28.
- [6] TOGAWA, R. C.; BRIGIDO, M. M. 2003. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology, IcoBiCoBi. Ribeirão Preto.
- [7] EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. ; GREEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. accuracy assessment. *Genome Res.*, v. 8, n. 3, p. 175-185.
- [8] ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAEFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402.
- [9] NAKAMURA, I.; KAMEYA, N.; AOKI, T.; TADA, T.; NORITA, E.; KANZAKI, H.; UCHIMIYA, H. 1995. Nucleotide sequence of a rice cDNA encoding a homolog of the eukaryotic ribosomal protein S8. *Plant Physiol.*, v. 107, n. 4, p. 1463-1464.
- [10] MERIANOS, H. J.; WANG, J. ; MOORE, P. B. 2004. The structure of a ribosomal protein S8/*spc* operon mRNA complex. *RNA*, v.10, n.6, p.954-964.
- [11] ABEBE, T.; SKADSEN, R. W.; KAEPLER, H. F. 2004. Cloning and identification of highly expressed genes in barley lemma and palea. *Crop Science*, v. 44, n. 3, p. 942-950.
- [12] TURLEY, R. B.; FERGUSON, D. L.; MEREDITH JR, W. R. 1994. Isolation and characterization of a cDNA encoding ribosomal protein L41 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Physiology*, v. 105, n. 4, p. 1449-1450.

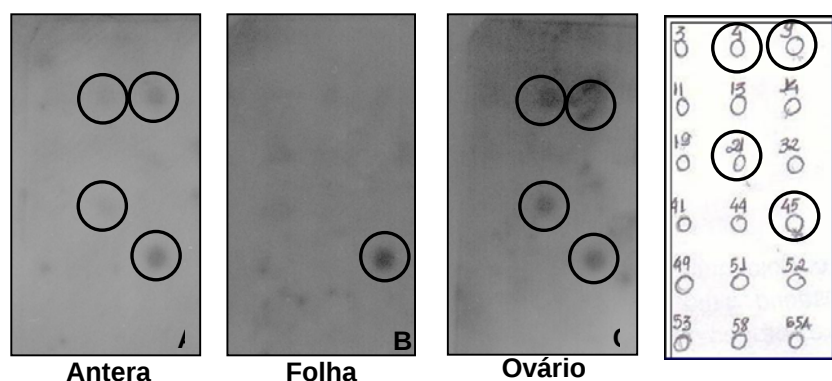


Figura 1 - Análise por *northern* reverso de seqüências de cDNA de expressão diferencial em ovários de plantas de *B.brizantha* apomíticas cv. Marandu e sexuais (BRA 002747) em técnica de dot-blot. O DNA plasmidial foi aplicado na membrana na concentração de 250 ng e hibridizado contra cDNA de anteras (A), folhas (B) e ovários (C), marcado radioativamente. Em detalhe, mapa da membranas indicando a posição dos clones 04, 09, 21 e 45.

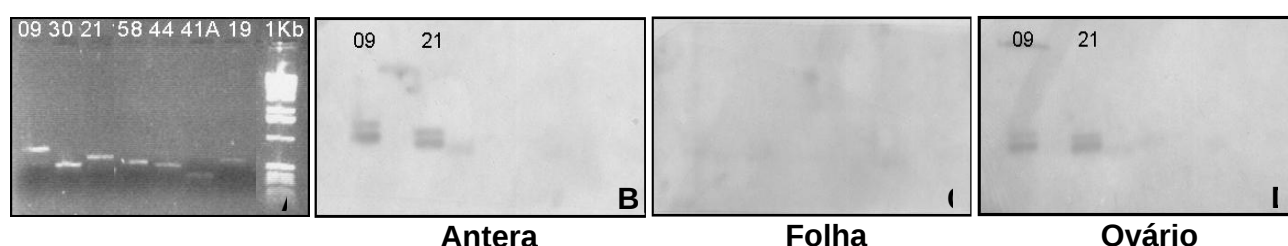


Figura 2 - Análise por *northern* reverso de seqüências de cDNA de expressão diferencial em ovários de plantas de *B.brizantha* apomíticas cv. Marandu e sexuais (BRA 002747) amplificadas por PCR. A - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação por PCR das seqüências dos clones isolados de DD-PCR de *B. brizantha* apomíticas cv. Marandu (clone 30) e clones não diferenciais (clones 09, 19, 21, 41A, 44 e 58). Como marcador de massa molecular foi usado 1Kb *DNA ladder*. O DNA resultante de amplificações por PCR das seqüências diferenciais foi aplicado em réplicas nos géis, transferido para membranas e hibridizado contra cDNA de anteras (B), folhas (C) e ovários (D) marcados radioativamente.

Tabela 1: Análise das seqüências dos clone 09 e 21 utilizando o programa BLASTN contra o banco nr (não redundante) de nucleotídeos do NCBI (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) [8].

Clone	Sequência	e-value	Similaridade
09	DQ244259.1 <i>Zea mays</i>	3e-61	87%
	U64436.1 <i>Zea mays</i> - proteína ribossomal S8	1e-60	88%
	D38010.1 <i>Oryza sativa</i> -proteína ribossomal S8	9e-46	86%
	DQ428095.1 <i>Sorghum bicolor</i> seqüência genômica	3e-27	92%
	AY086963.1 <i>A. thaliana</i> clone 29997 mRNA	4e-20	88%
21	AK105083.1 <i>Oryza sativa</i> - cDNA clone	2e-34	98%
	AY109380.1 <i>Zea mays</i> CL2281_1 mRNA sequence	9e-30	96%
	AP008214.1 <i>Oryza sativa</i> - cromossomo 8	1e-25	98%
	AJ001160.1 <i>Hordeum vulgare</i> L41 ribosomal protein	1e-19	92%
	U26255.1 <i>Nicotiana tabacum</i> ribosomal protein L41	5e-22	93%