

Proposta para bolsa PIBIC – CNPEM

Pesquisadora: Dra. Lucia Mattiello – PPB - CTBE

Análise da expressão de genes específicos de tecidos fonte e tecidos dreno para a análise do estágio de desenvolvimento celular ao longo da folha +1 de cana-de-açúcar

Introdução

A cana-de-açúcar possui metabolismo fotossintético C_4 . Nas plantas C_4 , o carbono é fixado em um composto primário de quatro carbonos nas células do mesófilo foliar e esse composto é então transferido para as células da bainha vascular onde o CO_2 é liberado e participa das reações bioquímicas que irão fixar o CO_2 em forma de carboidrato. Desta forma, essas etapas de concentração de CO_2 e fixação de CO_2 , estão, fisicamente separadas nas plantas C_4 , o que confere à este grupo altas taxas de fotossíntese. Entender o desenvolvimento, os sinais intercelulares do tecido fonte são primordiais para, futuramente, manipularmos a atividade fotossintética e aumentarmos a produtividade da cana-de-açúcar.

Diferentemente da cana-de-açúcar, onde a quantidade de informações sobre os mecanismos fotossintéticos ainda são limitantes, no milho existem diversos trabalhos que versam sobre este tema. As folhas das gramíneas são excelentes ferramentas de estudo para o estabelecimento da função fotossintética, pois, a fotossíntese C_4 é estabelecida ao longo do eixo de desenvolvimento da lâmina foliar, sendo que na base as células são imaturas e não-diferenciadas e a na direção da ponta as células das células do mesófilo e da bainha vascular se tornam mais maduras e especializadas.

Estudos transcricionais em milho evidenciaram que 64% dos genes eram diferencialmente expressos em diferentes segmentos da folha ao longo do desenvolvimento e 21% entre células do mesófilo e da bainha vascular. Além disso, o transcriptoma se revelou bastante dinâmico, com transcritos relacionados com parede celular primária e metabolismo celular básico com maior abundância na base da folha (região imatura – sendo esta região considerada um dreno, já que a fotossíntese não está estabelecida) com a transição de transcritos relacionados com biossíntese da parede celular secundária e desenvolvimento da fotossíntese C_4 em direção à ponta da folha (região madura – e efetivamente o tecido fonte). Outro estudo focou nas relações entre as células do mesófilo e da bainha vascular, sendo que 14.972 genes foram expressos em células do mesófilo e 17.269 nas células da bainha vascular. As categorias funcionais as quais pertencem esses genes também foram bastante distintas entre os tipos celulares. Células do mesófilo são mais especializadas em reações dependentes de luz, síntese e *folding* de proteínas, síntese de tetrapiról, ligação com RNA enquanto que as células da bainha vascular possuem um maior número de genes relacionados com transporte, sinalização, degradação de proteínas, modificação pós-translacional, metabolismo de carbono, nitrogênio e oxigênio, divisão e organização celular e desenvolvimento. Análise proteômica em larga escala também já foi reportada para os diferentes segmentos da folha de milho com estágios de desenvolvimento distintos e para as células do mesófilo e da bainha vascular.

Ao longo da folha de milho existe uma transição fonte-dreno relacionada com o estado de maturação das células e a expressão de genes específicos de cada um desses estágios pode ser monitorada através de qRT-PCR. Nenhum estudo neste sentido foi abordado para cana-de-açúcar, portanto, essa proposta visa avaliar o padrão de expressão de genes tipicamente de tecidos fonte e de tecidos dreno ao

longo da lâmina foliar e, assim, verificar se na folha +1 da cana-de-açúcar também existe uma transição fonte-dreno que possa ser usada para estudos posterior de desenvolvimento foliar.

Nesta proposta o aluno de IC irá desenvolver habilidades e aprender técnicas de biologia molecular para avaliar a expressão de genes.

- coleta de amostras vegetais
- extração de RNA mensageiro
- cuidados na manipulação de amostras de RNA
- gel de agarose denaturante
- análise da qualidade de amostras de RNA por espectrofotometria
- desenho de primers para PCR em Tempo Real com o uso de softwares específicos
- execução de experimentos de PCR em Tempo Real
- análise de dados de PCR em Tempo Real.

Materias e métodos

Material Vegetal

As plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 serão cultivadas a partir de toletes obtidos de colmos gentilmente cedidas pelo CTC (Piracicaba, SP). Os colmos serão seccionados e selecionados de acordo com a massa fresca para homogeneização do conteúdo de reserva para brotação. Os toletes serão plantados em bandejas de plástico com substrato Plantmax® e mantidos a pleno sol até a sua brotação. Para os experimentos utilizaremos plantas com cerca de 15 dias após o plantio.

Coleta de segmentos foliares

As coletas dos diferentes segmentos foliares serão realizadas ao meio. As medidas de folha + 1 de cada planta serão aferidas e contadas em 10 segmentos de igual tamanho. Os segmentos serão congelados em nitrogênio líquido, macerados e utilizados para as diferentes técnicas propostas.

Extração de RNA e qRT-PCR para avaliação da maturidade do tecido

O RNA total das amostras de cada segmento foliar será extraído com o RNeasy Mini Kit (Quiagen, USA) de acordo com as indicações do fabricante e com a etapa de digestão por DNase *on-column*. Será executado qRT-PCR de genes específicos para determinar a maturidade do tecido. cDNA será produzido com a enzima SuperScript® III (Invitrogen) e as reações de qRT-PCR serão conduzidas Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems), no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems) e o software do mesmo para a análise dos resultados. Os genes a serem utilizados são aqueles indicadores da transição entre estágios de fonte/dreno.