

**Boletim de Pesquisa** 196

---

**e Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 340

Dezembro, 2007

**PREPARAÇÃO DE OVÁRIOS DE  
*BRACHIARIA* PARA LCM (Laser Capture  
Microdissection) - MICRODISSECÇÃO  
POR CAPTURA A LASER**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 196**

## **PREPARAÇÃO DE OVÁRIOS DE BRACHIARIA PARA LCM (Laser Capture Microdissection) - MICRODISSECÇÃO POR CAPTURA A LASER**

Erica Duarte Silveira  
Diva Maria de Alencar Dusi  
Vera Tavares de Campos Carneiro

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*  
Brasília, DF  
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

#### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

#### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

##### **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

S 587 Silveira, Erica Duarte

Preparação de ovários de *Brachiaria* para LCM (Laser Capture Microdissection) - microdissecção por captura a laser / Erica Duarte Silveira, Diva Maria de Alencar Dusi, Vera Tavares de Campos Carneiro. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

10 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 196).

1. *Brachiaria* - desenvolvimento apomítico - vias moleculares. 2. *Brachiaria* - desenvolvimento sexual - vias moleculares. 3. Genes - desenvolvimento reprodutivo - apomixia. 4. Genômica funcional. I. Dusi, Diva Maria de Alencar. II. Carneiro, Vera Tavares de Campos. III. Título. IV. Série.

631.5233 - CDD 21.

# PREPARAÇÃO DE OVÁRIOS DE *BRACHIARIA* PARA LCM (Laser Capture Microdissection) - MICRODISSECÇÃO POR CAPTURA A LASER

---

Erica Duarte Silveira<sup>1</sup>  
Diva Maria de Alencar Dusi<sup>2</sup>  
Vera Tavares de Campos Carneiro<sup>3</sup>

## Introdução

*Brachiaria* é o gênero mais importante da família *Poaceae* no Brasil, considerando sua utilização para pasto e forragem. Os cultivares mais plantados são os apomíticos *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk devido às suas características adaptativas (VALLE et al., 2004). Em *Brachiaria*, o modo de reprodução por apomixia é predominante, e os acessos sexuais são diplóides ( $2n = 2x$ ) enquanto os apomíticos são poliplóides ( $2n = 4x$ ). Apomixa nesse gênero é do tipo apospórica, na qual um saco embrionário (tipo Panicum) é formado de uma célula nucelar diplóide. Essa célula (inicial apospórica) passa por divisões mitóticas para gerar um saco embrionário contendo quatro núcleos: duas sinérgidas, uma oosfera e um núcleo polar (GOBBE et al., 1981; LUTTS et al., 1994 ; DUSI e WILLEMSE, 1999a; NAUMOVA et al., 1999; ARAÚJO et al., 2000). A reprodução apomítica em *Brachiaria* difere da reprodução sexual em dois momentos do desenvolvimento do óvulo. No primeiro, células do nucelo se diferenciam em células apospóricas iniciais (IA) não reduzidas, nas proximidades do meiócito ou da tétrade em degeneração. No segundo momento, no estágio final da megagametogênese, a oosfera não-reduzida dará origem a um embrião sem fertilização.

A comparação dos genes expressos durante essas etapas de diferenciação do óvulo em ambos os modos de reprodução pode levar à detecção dos genes envolvidos nestes processos de modo comum, ou específico de cada mecanismo reprodutivo e do momento da diferenciação, e contribuir ao esclarecimento destas vias de desenvolvimento reprodutivo (SILVEIRA e CARNEIRO, 2004).

---

<sup>1</sup> Bióloga, MSc, doutoranda Universidade Federal do Rio de Janeiro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Eng. Agr., PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Bióloga, PhD. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A microdissecção por captura a laser (*Laser Capture Microdissection* -LCM) é uma técnica recente que permite isolar grupos de células de diferentes tecidos a partir de um corte histológico. Podem ser isoladas rápida e precisamente populações de células específicas e até células individuais (SPENCER et al., 2007). Ela foi inicialmente desenvolvida para microdissecção em cortes histológicos derivados de tecido animal, podendo ser aplicada para o isolamento de todas as células que possam ser identificadas em um corte histológico. LCM possibilita o isolamento de um pequeno conjunto de células de um tecido complexo, baseado na sua identificação tanto por aparência no microscópio quanto por sua localização ou coloração diferenciada. Laser infravermelho é utilizado para cortar uma membrana termo sensível aderida ao slide onde se encontram os cortes histológicos. As células de interesse são, então, micro dissecionadas pelo raio laser juntamente com a membrana e coletadas em tubos de microcentrífuga adaptados ao aparelho para extração de DNA, RNA, proteínas ou metabólitos enquanto o tecido restante é preservado (NELSON et al., 2006).

Atualmente, a LCM está sendo utilizada em estudos de perfil de expressão de diferentes tecidos e células em plantas. Em *A. thaliana*, LCM e chips de microarranjo foram utilizados para comparação do perfil de expressão de diferentes grupos de células durante a embriogênese (CASSON et al., 2005; CAI e LASHBROOK, 2006; SPENCER et al., 2007). Nosso projeto tem como um dos principais objetivos conhecer as vias moleculares que são alteradas durante o desenvolvimento apomítico e sexual em *Brachiaria* utilizando técnicas de genômica funcional, e também identificar os genes responsáveis pelo desenvolvimento reprodutivo por apomixia. Para extração de RNA, vêm sendo utilizados pistilos completos ou ovários isolados em diferentes estágios de desenvolvimento, que são associados às diferentes etapas da megasporogênese ou megagametogênese por meio de associações com características dos pistilos como tamanho e cor. O estabelecimento de técnica de LCM em ovários de *Brachiaria* permitirá o isolamento de tecidos ou células mais específicos dos óvulos com a exclusão daqueles que não estão diretamente envolvidos na diferenciação das células apospóricas iniciais e por consequência do embrião autônomo, favorecendo a extração de RNAs expressos especificamente nas células de interesse. Neste trabalho apresentamos o estabelecimento de um protocolo para preparação de cortes histológicos de inflorescência e de ovários de *Brachiaria brizantha* para utilização em LCM.

O isolamento de células para LCM baseou-se no método desenvolvido para captura de células de diferentes tecidos de inflorescência de *Arabidopsis thaliana* utilizando fixação em ácido acético/etanol, como descrito por Cai e Lashbrook (2006).

## Material e Métodos

### Material Vegetal

*Brachiaria brizantha* cv Marandu, acesso BRA 000591 apomítica e *Brachiaria brizantha* sexual, acesso BRA 002747, fornecidas pela Embrapa Gado de Corte – MS e mantidas em campo na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, são utilizadas como fontes de espiguetas em diferentes estágios de desenvolvimento. Os genótipos escolhidos foram caracterizados previamente de forma a identificar os estágios de desenvolvimento para análises moleculares posteriores (ARAÚJO et al., 2000). Microdissecção a laser de material fixado será utilizado para isolar populações puras de células que serão utilizadas nos experimentos de microarranjo e RT-PCR.

Observação - Todo o procedimento de preparo do material até o seccionamento e deparafinização deve ser realizado a 4 °C, para evitar ação de RNAses.

### Fixação

Inflorescências de *B. brizantha* foram imersas em 10 volumes de solução fixadora gelada contendo etanol absoluto: ácido acético (3:1). As amostras foram fixadas no vácuo por 5 a 6 horas à 4°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas duas vezes em solução de etanol 75% (v/v), a 4°C, por 30 min.

### Desidratação e Infiltração

As amostras foram desidratadas em etanol 95% (v/v); por 30 minutos, três vezes em etanol absoluto por 30 min cada, 45 min em solução contendo etanol absoluto: xileno, 1:1 e 3 vezes em xileno 100% por 45 minutos.

Após a infiltração, pastilhas de Paraplast X-Tra™ foram adicionadas a cada duas horas até que o Paraplast X-Tra™ não mais derretesse. O material foi, então, transferido para forno a 58 °C e 1/3 do volume foi substituído por Paraplast X-Tra™ líquida 3 vezes, em intervalos de aproximadamente quatro horas. A mistura de parafina/xilol foi, então, substituída por Paraplast X-Tra™ líquida pura e o material vegetal foi emblocado e armazenado a 4 °C.

### Secção

Para montagem das lâminas, secções de 10 µm de espessura foram posicionadas em lâminas de vidro específicas para a técnica de LCM. Imediatamente antes da microdissecção, os cortes foram deparafinados por 5 minutos em xilol, lavados em água livre de RNase e deixados a temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para secar.

Parte das lâminas foi corada em solução aquosa de Azul de toluidina 1% por 1 min, seca ao ar. A microdissecção foi feita utilizando o equipamento *Leica Laser Microdissection*.

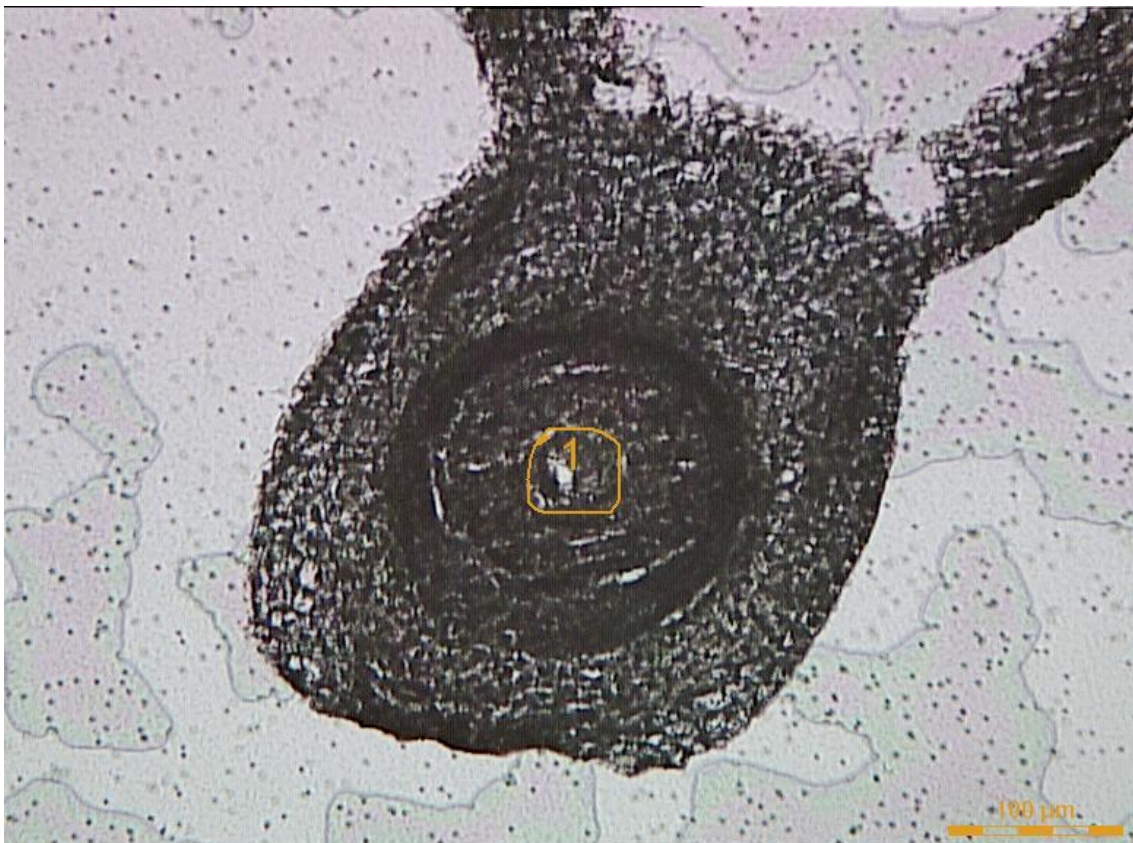
Tubos de microcentrífuga de 0,2 mL ou 0,5 mL foram usados para coleta do material durante a microdissecção a laser para em seguida ser realizado o processo de extração de RNA.

#### **Observações:**

Para análise de RNA após a microdissecção é recomendável que toda a vidraria e plásticos a ser utilizados seja livre de RNases.

### **Resultados e discussão**

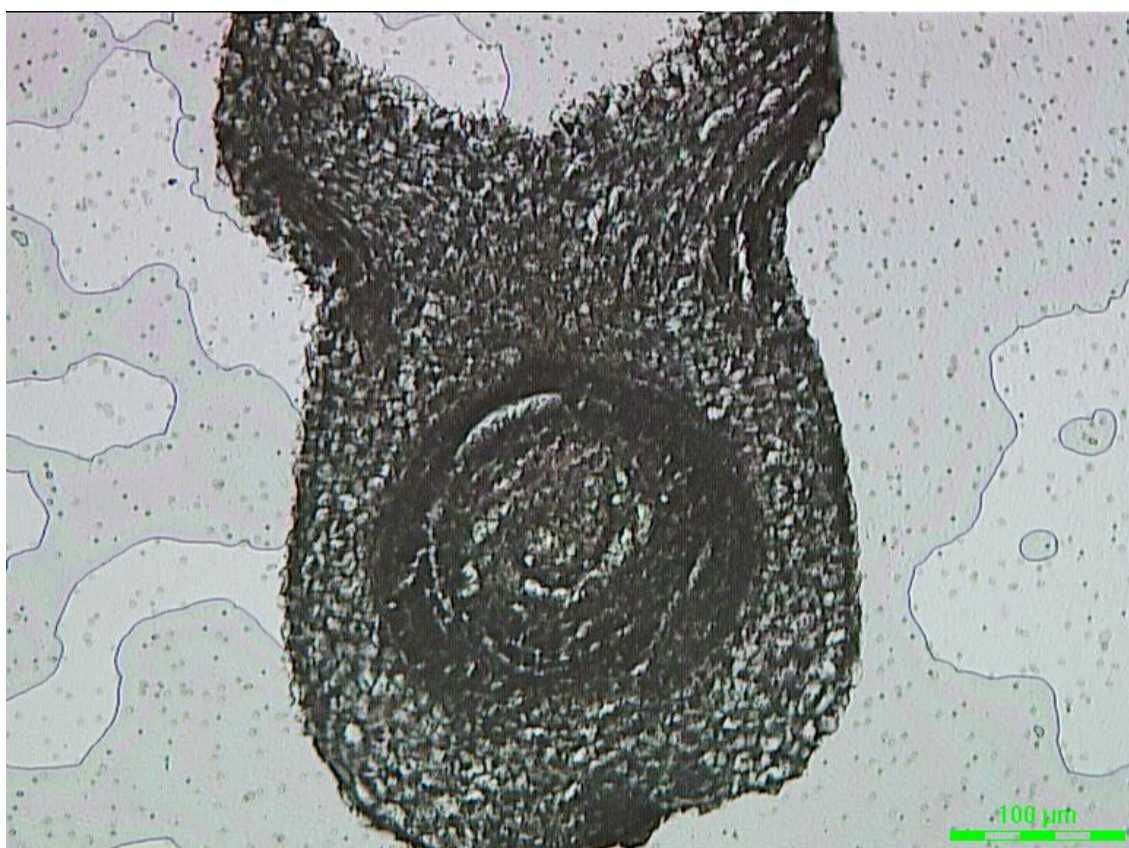
Nesse trabalho, secções de  $10\ \mu\text{m}$  de espessura de inflorescência e ovários foram observadas em microscopia de luz para verificação da integridade do tecido utilizando o protocolo de fixação descrito por Cai e Lashbrook (2006). Como observado na figura 1, utilizando coloração com laranja de acridina, foi verificada a preservação do RNA total e foi possível a identificação de células de diferentes tecidos do ovário de *B. brizantha* apomítica. Foram diferenciadas células dos tegumentos e células nucleares, e células do saco embrionário demonstrando a viabilidade da fixação em etanol: ácido acético (1:1) para a realização da microdissecção de células específicas às diferentes regiões do ovário de *B. brizantha* apomítica e sexual.





Uma vez verificada a integridade dos tecidos, as lâminas contendo secções de mesma espessura foram montadas para a microdissecção. Na figura 2 é apresentado ovário já deparafinado imediatamente antes da microdissecção e a figura 3 apresenta a secção após o corte, onde foram isoladas regiões contendo células iniciais apospóricas para posterior extração de RNA.

Como alternativa ao método de fixação e infiltração em resinas pode-se utilizar o congelamento de ovários e criomicrodissecção. Esse método permite extração de RNA de melhor qualidade, entretanto necessita de equipamento específico nem sempre disponível nos laboratórios. Infiltração em parafina favorece a preservação da morfologia do material vegetal, especialmente quando o tecido possui muitas células com grandes vacúolos. Além disso, permite a preservação dos cortes por um período mais longo.



O controle da apomixia é uma demanda de programas de melhoramento de *Brachiaria* para permitir a recombinação e aumentar o pool gênico dessa forrageira. A identificação de genes expressos em células precursoras do desenvolvimento de sacos embrionários do tipo Panicum, característico de plantas apomíticas contribuirá à compreensão das vias de expressão gênica associada a este modo de reprodução, primeiro passo para se estabelecer o controle de sua expressão. Marcadores moleculares poderão ser identificados visando permitir a identificação da apomixia sem a necessidade de análises morfológicas do saco embrionário.



Estudos genéticos e morfológicos de *B. brizantha* e *B. decumbens* apomítica e sexual estão sendo realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e também na Universidade Federal do Rio de Janeiro. A estratégia utilizada é caracterizar o desenvolvimento reprodutivo de plantas apomíticas pela comparação e identificação de genes diferencialmente expressos nas duas vias reprodutivas, sexual e apomítica. A caracterização citológica dos ovários sexuais e apomíticos de *Brachiaria* foi feita (ARAÚJO et al., 2000.; DUSI e WILLEMSE, 1999a, b) e seqüências de cDNA diferencialmente expressas nesses dois ovários foram identificadas pela técnica de differential display (DD)-PCR (DUSI, 2001; RODRIGUES et al., 2003). Clones que apresentaram diferenças na expressão entre ovários apomíticos e sexuais foram identificados (10 de ovários apomíticos e 1 de sexual). Dentre eles, seqüências que são específicas do desenvolvimento reprodutivo feminino. Hibridização in situ, metodologia que está totalmente estabelecida no laboratório (ALVES et al., 2007) tem sido utilizada para a determinação do papel dessas seqüências no desenvolvimento do saco embrionário apomítico não reduzido. A utilização da técnica de LCM associada à análise de expressão gênica comparativa entre os dois modos de reprodução irá contribuir para o entendimento da apomixia e para identificação de genes a ela associados. Para isso, é necessário o estabelecimento de um protocolo que permita a identificação das células que se deseja isolar e, principalmente, que garanta a integridade do material genético que será isolado a partir dessas células. Neste trabalho, foi ajustado um método de fixação e emblocamento de material de ovários de *Brachiaria brizantha* para utilização na microdissecção a laser. Apesar da espessura do corte e do fixador utilizado não favorecerem a identificação das células dos diferentes tecidos, foi possível a captura de células da região onde ocorre o início da diferenciação das células iniciais apospóricas. A partir desse material isolado será extraído RNA para estudos comparativos do padrão da expressão gênica durante a diferenciação das células iniciais apospóricas e megásporos sexuais.

## REFERÊNCIAS

ALVES, E. R.; CARNEIRO, V. T. C.; ARAÚJO, A. C. G. Direct Evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 14, p. 207-212. 2001.

ALVES, E.; CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. In situ localization of three cDNA sequences associated to the later stages of aposporic embryo sac development of *Brachiaria brizantha*. **Protoplasma**, New York, v. 231, p.161–171, 2007.

ARAÚJO, A. C. G.; MUKHAMBETZHANOV, S.; POZZOBON, M. T.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Female gametophyte development in apomictic and sexual *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Revue de Cytologie et de Biologie Vegetales - Le Botaniste**, Paris, v. 23, n. 1-2, p. 13-28, 2000.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.

CAI, S.; LASHBROOK, C. C. Laser capture microdissection of plant cells from tape-transferred paraffin sections promotes recovery of structurally intact RNA for global gene profiling. **Plant Journal**: for cell and molecular biology, Oxford, GB, v. 48, n. 4, p. 628-37, 2006.

CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispority, tetraspority, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 61, n. 1, p. 51-94, 1997;

CASSON, S.; SPENCER, M.; WALKER, K.; LINDSEY, K. Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of Arabidopsis. **Plant Journal** : for cell and molecular biology, Oxford, GB, v. 42, n. 1, p. 111-23, 2005.

CHEN, L.; MIYAZAKI, C.; KOJIMA, A.; SAITO, A.; ADACHI, T. Isolation and characterization of a gene expressed during early embryo sac development in apomictic guinea grass (*Panicum maximum*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 154, p. 55-62, 1999.

DUSI, D. M. A. **Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf**. 2001. 167 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Wageningen, Wageningen.

DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Activity and localisation of sucrose synthase and invertase in ovules of sexual and apomictic *Brachiaria decumbens*. **Protoplasma**, New York, v. 208, p. 173-185, 1999a.

DUSI, D. M. A.; WILLEMSE, M. T. M. Apomixis in *Brachiaria decumbens* Stapf : gametophytic development and reproductive calendar. **Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica**, Krakow, v. 41, p.151-162, 1999b.

GOBBE, J.; SWENNE, A.; LOUANT, B. P. Diploïdes naturels et autotetraploïdes induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard: criteres d'identification. **Agron Trop**, v. 36, p. 339-346, 1981.

KOLTUNOW, A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perpective. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, US, v. 54, p. 547-574, 2003.

LEBLANC, O.; ARMSTEAD, I.; PESSINO, S.; ORTIZ, J. P. A.; EVANS, C.; VALLE, C. B. do; HAYWARD, M. D. Non-radioactive mRNA fingerprinting to visualise gene expression in mature ovaries of *Brachiaria* hybrids derived from *B. brizantha*, an apomictic tropical forage. **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 126, p. 49-58, 1997.

LUTTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B. P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomitic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine-induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, Wageningen, NL, v. 78, p. 19-25, 1994.

MANZANO, S. **Desenvolvimento de um método de transformação genética de *Brachiaria spp.* por bombardeamento de partículas**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

NAUMOVA, T. N.; HAYWARD, M. D.; WAGENVOORT, M. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v.12, p. 43-52, 1999.

NAUMOVA, T. N.; VAN DER LAAK, J.; OSADTCHIY, J. V.; MATZK, F.; KRAVTCHENKO, A.; BERGERVOET, J.; RAMULU, K. S.; BOUTILIER, K. Reproductive development in apomictic populations of *Arabid holboellii* (Brassicaceae). **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 14, p. 195-200, 2001.

NELSON, T.; TAUSTA, S. L.; GANDOTRA, N.; LIU, T. Laser microdissection of plant tissue: What you see is what you get. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, US, v. 57, p. 181-201, 2006.

PESSINO, S. C.; ESPINOZA, F.; MARTINEZ, E. J.; ORTIZ, J. P.; VALLE, E. M.; QUARIN, C. L. Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum*. **Hereditas**, Lund, Suécia, v. 134, p. 35-42, 2001.

RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; DUSI, D. M.; MELLO, L. M.; RIDGEN, D. J.; CARNEIRO, V. T. C. Identification of differentially expressed cDNA sequences in ovaries of sexual and apomictic plants of *Brachiaria brizantha*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 53, p. 745-757, 2003.

SILVEIRA, E. D.; CARNEIRO, V. T. de C. Análise da expressão de genes associados à apomixia. In: CARNEIRO, V. T. de C.; DUSI, D. M. de A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 113-126.

SILVEIRA, E. D.; RODRIGUES, J. C. M.; CABRAL, G. B.; LEITE, J. A.; COSTA, S. S.; CARNEIRO, V. T. C. Evaluation of Exogenous promoters for use in *Brachiaria brizantha* transformation. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 5, p. 87-93, 2003.

SPENCER, M. W. B.; CASSON, S. A.; LINDSEY, K. Transcriptional profiling of the Arabidopsis embryo. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 143, n. 2, p. 924-40, 2007.

TUCKER, M. R.; ARAUJO, A. C. G.; PAECH, N. A.; HECHT, V.; SCHIMIDT, E. D. L.; ROSSELL, J. B.; DE VRIES, S. C.; KOLTUNOW, A. M. G. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **The Plant Cell**, Rockville, US, v. 15, p. 1524-1537, 2003.

VALLE, C. B. de.; BONATO, A. L. V.; PAGLIARINI, M. S.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. de C.; DUSI, D. M. de A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 47-66.

VIELLE-CALZADA, J. P.; NUCCIO, M. L.; BUDIMAN, M. A.; HOMAS, T. L.; BURSON, B. L.; HUSSEY, M. A.; WING, R. A. Comparative gene expression in sexual and apomictic ovaries of *Pennisetum ciliari* (L.) Link. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 32, p. 1085-1092, 1996.