



HORLLYS GOMES BARRETO

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE
TRANSCRICIONAL DE COMPONENTES
GENÉTICOS ENVOLVIDOS COM
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Medicago
truncatula***

LAVRAS – MG

2013

HORLLYS GOMES BARRETO

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE
COMPONENTES GENÉTICOS ENVOLVIDOS COM EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM *Medicago truncatula***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

PhD. Antonio Chalfun Júnior

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Barreto, Horllys Gomes.

Identificação e análise transcricional de componentes genéticos envolvidos com embriogênese somática em *Medicago truncatula* / Horllys Gomes Barreto. – Lavras : UFLA, 2013.

89 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Antonio Chalfun Júnior.

Bibliografia.

1. Planta modelo. 2. Bioinformática. 3. Transcriptoma. 4. qPCR.
5. RNAseq. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 574.87328

HORLLYS GOMES BARRETO

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE
COMPONENTES GENÉTICOS ENVOLVIDOS COM EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA EM *Medicago truncatula***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 22 de abril de 2013.

PhD. Vagner Augusto Benedito

WVU

Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

PhD. Renato Paiva

UFLA

PhD. Carlos Henrique S. de Carvalho

EMBRAPA CAFÉ

PhD. Antonio Chalfun Júnior
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Dedico a Deus, por acreditar em mim, mesmo com todos os meus defeitos e
fazer por mim o que tão pouco mereço.

Thank You God!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as pessoas que Ele colocou em minha vida para que este sonho se tornasse realidade;

À minha família, por simplesmente ser a minha família; aos meus pais, Deuzamar Gomes Pereira e Francisca das Chagas Correia Barreto, que pela graça de Deus me deram a vida;

Ao Rosemberg Pereira de Abreu que considero como um Pai;

À minha noiva (Solange Ságio), que esteve ao meu lado durante o doutorado, apoiando e ajudando em tudo, e nossa cachorra (Mina) uma companheira e tanto. Simplesmente as amo!

Aos Professores da Universidade Federal do Tocantins (UFT), pelos ensinamentos necessários para pleitear um curso de Pós-Graduação, em especial aos professores; Alan Barbiero, Valéria Momenté, Eduardo Erasmo e Jacinto Santos, que me incentivaram a seguir a carreira científica. Além do Professores, quero deixar minha gratidão a meu amigo Adeilson Carvalho (Ex-Motorista da UFT e atual Diretor de Transportes e Máquinas – UFLA), de quem também contei com o apoio;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado, em especial ao professor Luciano Paiva, que brilhantemente tem conduzido o programa, “oxigenando” todas as pesquisas que são desenvolvidas no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência, em

especial aos professores Chalfun Júnior, Luciano Paiva, Alan Andrade e Pierre Maraccini;

Ao Professor Chalfun Júnior, pela oportunidade, orientação, paciência, dedicação, amizade, companheirismo e ensinamentos, que foram de grande importância para a realização deste trabalho e meu crescimento pessoal e profissional. O meu muito obrigado!!!

A West Virginia University (WVU), pela oportunidade de fazer um treinamento em Biologia Molecular durante o curso de doutorado, em especial ao professor Vagner Benedito, com quem trabalhei e aprendi bastante durante o meu doutorado;

Aos membros da banca, Chalfun Júnior, Vagner Benedito, Luciano Paiva, Renato Paiva, Carlos Henrique, Antônio Paulino e Pierre Marracini, pelo apoio e colaboração;

Por fim, às amigas Lina Yang e Christina Wyman, em nome do Laboratory of Plant Functional Genetics (WVU), aos amigos Fabrício Lelis e Luiz Gustavo, em nome de todos do Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), aos amigos André Lima, Solange Ságio, Rafael Moreira e Pâmela Marinho, em nome de todos aqueles que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e dos membros do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP). Finalmente o meu obrigado a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO GERAL

A embriogênese somática em plantas é um processo pelo qual células se diferenciam em embriões, o que possibilita o melhoramento vegetal por meio de estudos envolvendo o uso de técnicas de cultura de tecidos e técnicas moleculares. No entanto, para muitas espécies leguminosas, com destaque para culturas economicamente importantes, a embriogênese somática se coloca como uma etapa limitante do melhoramento vegetal por meio dessas técnicas. O objetivo com este trabalho foi analisar os componentes genéticos envolvidos com a indução e desenvolvimento de embriões somáticos em *Medicago truncatula*. As análises *in silico* na base de dados IMGAG (*International Medicago Genome Annotation Group*) v.3.5 permitiram a identificação de dois genes *MADS-box* do tipo MIKC, *MtFUSCA3* e *MtABI3*. Os genes *MADS-box* do tipo MIKC compreendem uma das principais famílias de fatores de transcrição das plantas, cujos membros estão envolvidos em diversos processos de desenvolvimento, principalmente na embriogênese somática. A confirmação da identidade dos genes encontrados foi feita por meio do alinhamento das sequências obtidas com genes *MADS-box* do tipo MIKC previamente identificados em outras espécies. O perfil de expressão relativa por PCR em tempo real mostrou que os genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* podem estar diretamente envolvidos na regulação da embriogênese somática em *Medicago truncatula*. Análises adicionais de expressão, por meio de PCR em tempo real, RNAseq e microarranjos, sugerem que os genes *MtSVPa* (Medtr5g032520.1), *MtSVPb* (Medtr5g032150.1), *MtSVPc* (Medtr4g093970.1), *MtAGL24* (Medtr5g066180.1), *MtSOC.1* (Medtr7g075870.1), *MtAP3a* (Medtr3g113030.1), *MtAP3b* (Medtr5g021270.1), *MtAGL21.1* (Medtr5g031000.1) e *MtAGL21.2* (Medtr5g031000.2) também estão diretamente envolvidos na regulação da embriogênese somática em *Medicago truncatula*. Os genes *MtAGL21.1*, *MtAGL21.2* e *MtSOC.1* apresentaram padrão de expressão diferencial para linhagens embriogênicas (M9-10a e 2HA) quando comparadas com as linhagens-controles não-embriogênicas ou pouco embriogênicas (M9 e Jemalong). A caracterização funcional desses genes pode ajudar a desvendar os componentes genéticos responsáveis pela embriogênese somática em *Medicago truncatula*.

Palavras-chave:: Embriogênese somática. Bioinformática. Transcriptoma. RNAseq. qPCR.

GENERAL ABSTRACT

Plant somatic embryogenesis is a process through which cells differentiate in embryos, allowing plant genetic improvement by means of studies involving the use of tissue culture and molecular techniques. However, for many leguminous species, especially economically important cultures, somatic embryogenesis is placed as a limiting stage for plant breeding while using these techniques. The objective of this work was to analyze the genetic components involved with the induction and development of *Medicago truncatula* somatic embryos. The *in silico* analysis in the *International Medicago Genome Annotation Group v. 3.5* (IMGAG) database enabled the identification of two MICK-type *MADS-box*, *MtFUSCA3* and *MtABI3* genes. *MICK-type MADS-box* genes constitute one of the main families of plant transcriptional factors, whose members are involved in several developmental processes, especially in somatic embryogenesis. The identity confirmation of the genes found was done through sequence alignments obtained with *MICK-type MADS-box* genes, previously identified in other species. The relative expression profile, performed by real-time PCR showed that genes *MtFUSCA3* and *MtABI3* may be directly involved in *Medicago truncatula* somatic embryogenesis. Additional expression analysis, performed by Real-time PCR, RNAseq and microarray, suggest that the genes *MtSVPa* (Medtr5g032520.1), *MtSVPb* (Medtr5g032150.1), *MtSVPc* (Medtr4g093970.1), *MtAGL24* (Medtr5g066180.1), *MtSOC.1* (Medtr7g075870.1), *MtAP3a* (Medtr3g113030.1), *MtAP3b* (Medtr5g021270.1), *MtAGL21.1* (Medtr5g031000.1) and *MtAGL21.2* (Medtr5g031000.2), are also directly involved in the regulation of *Medicago truncatula* somatic embryogenesis. Genes *MtAGL21.1*, *MtAGL21.2* e *MtSOC. 1* presented a differential expression standard between the embryogenic lines (M9-10a and 2HA) when compared to the less or non-embryogenic control lines (M9 and Jemalong). The functional characterization of these genes can aid in elucidating the genetic components responsible for the *Medicago truncatula* somatic embryogenesis process.

Keywords: Somatic embryogenesis. Bioinformatics. Transcriptome. RNAseq. qPCR.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 10
2	REFERENCIAL TEÓRICO 12
2.1	Planta modelo 12
2.2	Biodiversidade 14
2.3	Embriogênese somática 15
2.4	Transformação genética 17
2.5	Estudo de mutantes 18
2.6	Mapa genético 20
2.7	Genômica funcional 22
2.8	Perspectivas 23
	REFERÊNCIAS 24
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 33
	ARTIGO 1 Análise <i>in silico</i> e transcricional dos genes da subfamília de fatores de transcrição LEC2/ABI3 durante a embriogênese somática em <i>Medicago truncatula</i> 33
	ARTIGO 2 Caracterização dos genes tipo MICK da família MADS-box em <i>Medicago truncatula</i> durante a embriogênese somática <i>in vitro</i> 60

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As leguminosas (*Fabaceae*) englobam a terceira maior família do reino vegetal, depois das famílias *Orchidaceae* e *Asteraceae* (POLHILL; RAVEN, 1981). Os legumes são, entretanto, a segunda família mais importante do ponto de vista econômico, perdendo apenas para família dos cereais (*Poaceae*), além de apresentar importantes características para sustentabilidade agrícola, em especial a fixação biológica de nitrogênio, característica essa apresentada pelas espécies dessa família, que agem em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, que estão presentes no solo.

As leguminosas são espécies importantes em vários aspectos, como para a produção de alimentos (soja, feijão, ervilha, lentilha, amendoim), forragem (alfafa, trevo, *Medicago truncatula*), biodiesel (soja, amendoim, *Pongania* spp.), madeira (*Acacia* spp.), corante natural (*Indigofera* spp.), plantas ornamentais (*Cytisus* spp, *Medicago* spp.), adubo verde (*Vicia* spp, *Crotalaria* spp, *Stylosanthes* spp) e estudos genéticos (*Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Pisum sativum*, *Glycine max*).

Quanto aos estudos genéticos, a *Arabidopsis thaliana* foi a espécie escolhida como modelo para estudos de vegetais, por apresentar características que facilitam a sua manipulação. No entanto, *Arabidopsis* não abrange todos os aspectos da biologia vegetal e modelos alternativos foram necessários (BENEDITO, 2007).

A espécie *Medicago truncatula*, uma espécie próxima da alfafa, é uma planta modelo alternativa para leguminosas (BENEDITO et al., 2008), além de ser evolutivamente mais relacionada às espécies vegetais economicamente importantes (facilitando a transferência de conhecimento para essas culturas),

abrange também aspectos biológicos não apresentados em *Arabidopsis*, como a fixação biológica de nitrogênio, alta produção de metabólitos secundários (flavonóides), e biologia do desenvolvimento mais complexa (folhas compostas, arquitetura foliar complexa, formação de tricomas multicelulares glandulares e não glandulares).

Recentemente, um elevado número de trabalhos relacionados à espécie *Medicago truncatula* têm sido realizados, e informações importantes como o genoma sequenciado (ANÉ; ZHU; FRUGOLI, 2008; YOUNG et al., 2005), transcriptoma (BENEDITO et al., 2008; HE et al., 2009), e mutantes para diversos genes (TADEGE et al., 2008; TADEGE; RATET; MYSORE, 2005), já se encontram disponíveis. Essas ferramentas permitirão estudos detalhados sobre a genômica funcional em leguminosas economicamente importantes (PIRES et al., 2012; YOUNG et al., 2011; YOUNG; UDVARDI, 2009) ressaltando assim a necessidade de estudos da biologia funcional dessa leguminosa modelo.

Diante disso, o objetivo com esse trabalho é fazer uma abordagem sobre o papel da planta modelo *Medicago truncatula* para o estudo da genética molecular de leguminosas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Planta modelo

A espécie *Arabidopsis thaliana* foi escolhida como modelo para estudos em vegetais por apresentar características que facilitam sua manipulação, tais como porte pequeno, ciclo de vida rápido, altamente produtiva, fácil cultivo em laboratório, autógama, genoma relativamente pequeno, poucos cromossomos, facilidade para realização de cruzamentos, protocolos estabelecidos para a transformação genética e extrações químicas. No entanto, *Arabidopsis* não abrange todos os aspectos da biologia vegetal e modelos alternativos foram necessários (BENEDITO, 2007).

Algumas espécies de plantas da família das leguminosas já foram extensivamente estudadas em nível molecular, com o objetivo de encontrar um modelo para o estudo de leguminosas, porém, seus grandes genomas, grandes sequências repetitivas, ploidia complexa e dificuldades na regeneração de

plantas transgênicas o que tem limitado severamente os estudos científicos nesta família (Tabela 1).

Tabela 1 Leguminosas modelo

Nome científico	Origem	Genoma (Mbp)	Ploidia e n° de cromossomos
<i>Medicago truncatula</i>	Mediterrâneo	500	Diploide n=8
<i>Lotus japonicus</i>	Leste da Ásia	472	Diploide

<i>Pisum sativum</i>	Ásia Central e Oriente	$\cong 5000$	n=6 Diploide
<i>Glycine max</i>	China e Sibéria	1100	n=7 Alopoliploide n=20

Diante disso, a espécie *Medicago truncatula* surgiu como o modelo ideal para o estudo genético em leguminosas, pois apresenta um pequeno genoma diploide (próximo do genoma da *Oryza sativa*, quatro vezes maior do que o da *Arabidopsis*, mas duas vezes inferior ao da *Glycine max* e dez vezes inferior ao da *Pisum sativum*), natureza autógama, elevada produção de sementes e ciclo de

vida curto (ARAÚJO et al., 2004), além de ser uma espécie forrageira, filogeneticamente próxima da espécie cultivada *Medicago sativa* e outras espécies de importância econômica, o que a colocam em vantagem com relação a *Lotus japonicus* que apresenta uma maior distância filogenética de espécies cultivadas (Tabela 1).

Os primeiros estudos utilizando a espécie *Medicago truncatula* como modelo foram realizados no início da década de 90, justamente sobre a simbiose que a planta exerce com a bactéria *Sinorhizobium meliloti*, durante o processo de fixação biológica de nitrogênio. Desde então, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com essa espécie modelo, tendo uma evolução significativa em vários campos, como no desenvolvimento radicular, metabolismo secundário, resistência a doenças, bem como na área da genômica (ANÉ; ZHU; FRUGOLI, 2008; YOUNG et al., 2005, 2011), e transcriptoma (BENEDITO et al., 2008; HE et al., 2009).

2.2 Biodiversidade

O gênero *Medicago* é originário da região da bacia do Mediterrâneo e está presente em todos os países da região mediterrânea como também nos países vizinhos (Figura 1). Além disso, durante o século XIX, foi introduzido em outras partes do mundo, por meio da migração europeia (Figura 1).

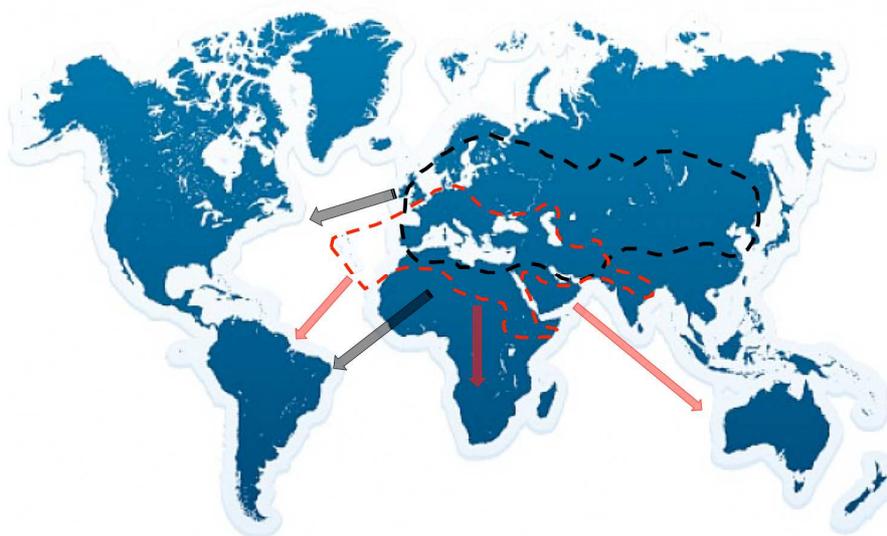


Figura 1 Distribuição do gênero *Medicago* no mundo adaptado de Delalande et al. (2007). A região com traços preto e vermelho indicam o centro de origem de plantas do gênero *Medicago* com ciclo de crescimento anual e perene, respectivamente. As setas pretas e vermelhas indicam onde elas foram introduzidas durante a migração europeia

Existem quatro centros de pesquisa (SARDI-Australian, South Australian Research and Development Institute; INRA-France, Institut National de la Recherche Agronomique; ARS-USDA, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture; e LILM-CBBC, Laboratoire

Interactions Légumineuses Microorganismes, Centre de Biotechnologie, Technopole de Borj, Tunísia) que por meio de um esforço internacional mantêm as quatro principais coleções dos recursos genéticos disponíveis para o estudo do gênero *Medicago* (DELALANDE et al., 2007). Um total de 9453 linhagens foram listadas, sendo 5703 para *Medicago truncatula*, 2887 para *Medicago littoralis* e 863 para *Medicago italica*. *Medicago truncatula* representa 60,4% de três espécies coletadas enquanto que *M. littoralis* representa 30,9% das coleções e *M. italica* apenas 9% (DELALANDE et al., 2007).

A espécie *Medicago truncatula* que apresenta a maior população, ainda é dividida em três subespécies, baseado em características morfológicas da vagem: *ssp. truncatula*, *ssp. tricycla* e *ssp. longeaculata*. Estudos demonstraram que a subespécie *tricycla* é geneticamente diferente das outras subespécies (BAQUERIZO-AUDIOT; DESPLANQUE; PROSPERI, 2001; ELLWOOD et al., 2006). Além disso, existe uma elevada variabilidade de caracteres quantitativos, qualitativos e moleculares que podem ser observados entre e dentro das populações (BONNIN; PROSPERI; OLIVIERI, 1996; CHAULET; PROSPERI, 1995), o que faz de *Medicago truncatula* uma espécie rica em biodiversidade, uma característica importante para uma planta modelo utilizada para o estudo de leguminosas.

2.3 Embriogênese somática

A embriogênese somática em plantas é o processo pelo qual as células diferenciam-se em embriões, reproduzindo o que normalmente acontece durante o desenvolvimento das sementes, entretanto, sem a união sexual dos gametas (ZIMMERMAN, 1993). Este processo pode ocorrer por duas vias, direta ou indireta, dependendo se passa pela fase de calo, que é uma massa de células indiferenciadas, potencialmente prontas para assumir qualquer via de

desenvolvimento, ditada pela interação entre o seu genótipo e o meio ambiente. Na via direta os embriões se desenvolvem a partir de células do tecido organizado do explante, enquanto que na indireta, os embriões se desenvolvem a partir de células de calos (WILLIAMS; MAHESWARAN, 1986).

Muitos estudos já foram realizados sobre fatores que exercem grande influência na embriogênese, tais como auxinas, citocininas, brassinosteroides e etileno (FENG et al., 2012; MANTIRI et al., 2008; RUSSINOVA et al., 2004; ZIMMERMAN, 1993), bem como sobre as alterações anatômicas durante a embriogênese somática (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; LAUX; WURSCHUM; BREUNINGER, 2004). Com relação aos mecanismos genéticos, a metilação do DNA parece ter um efeito importante (SANTOS; FEVEREIRO, 2002; SHIBUKAWA et al., 2009) enquanto que os componentes genéticos envolvidos na embriogênese, como genes que codificam para proteínas regulatórias ou que fazem parte de cascatas de sinais de indução e de desenvolvimento dos embriões somáticos estão sendo estudados (NOLAN; KURDYUKOV; ROSE, 2011).

Um desses genes é o *BABY BOOM* (BBM), que codifica para um fator de transcrição da família AP2/ERF (RIECHMANN et al., 2000). A expressão constitutiva desse gene promove a indução espontânea de embriões somáticos e estruturas cotiledonares em *Brassica napus* (BOUTILIER et al., 2002). Outro fator de transcrição é o *AGL15* da família *MADS-Box*. Em soja, verificou-se que a perda de função desse gene reduz a frequência de embriogênese somática, enquanto que sua superexpressão levou a um aumento da resposta embriogênica (THAKARE et al., 2008). Fatores de transcrição do tipo *homeobox*, como o *WUSCHEL* (WUS) e membros da família *WUSCHEL RELATED HOMEBOX* (WOX), também têm sido relacionados à embriogênese. Estes genes estão associados à regulação dos meristemas apical caulinar e floral (LAUX et al., 1996) e têm sido descritos como fundamentais no processo de iniciação de

culturas embriogênicas, assim como na embriogênese zigótica (HAECKER et al., 2004). Estudos recentes demonstram que genes dessa família são fortemente regulados por gradientes de auxina (PALOVAARA; HAKMAN, 2009; SU et al., 2009).

Dentre os genes envolvidos na rota de transdução de sinais que regulam a embriogênese, o mais estudado é o gene *SERK (SOMATIC EMBRIOGENESIS RECEPTOR- LIKE KINASE)*, o qual é considerado como o marcador de embriogênese, pela sua expressão transiente nas fases iniciais da embriogênese somática e zigótica (HECHT et al., 2001). A expressão desse gene em diferentes explantes é mediada pela presença de auxinas e tem sido relatada em várias espécies, dentre as quais *Daucus carota*, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum* e *Medicago truncatula* (HECHT et al., 2001; NOLAN; KURDYUKOV; ROSE, 2011; SCHMIDT et al., 1997; SINGLA; KHURANA; KHURANA, 2008).

2.4 Transformação genética

A espécie *Medicago truncatula* é passível de transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* e regeneração por meio da embriogênese somática, o que possibilita o estudo da função de genes associados às características de interesse. A primeira transformação genética bem sucedida em *Medicago truncatula* foi relatada há 21 anos (THOMAS; ROSE; NOLAN, 1992). O processo de transformação via *Agrobacterium*, geralmente inclui uma etapa de co-cultivo, que envolve a transferência de T-DNA para as células vegetais (explante), seguido de seleção e regeneração das células transformadas.

A linhagem A17 possui constituição genética derivada de Jemalong e foi o genótipo escolhido para o sequenciamento do genoma. Entretanto, o genótipo A17 apresenta baixa capacidade embriogênica somática *in vitro*. Existem três

linhagens de *Medicago truncatula* com alta capacidade embriogênica e utilizadas regularmente em estudos envolvendo embriogênese *in vitro*. A linhagem R108 foi escolhida como base genética para o desenvolvimento de uma grande população mutante que foi gerada recentemente pela Samuel Roberts Noble Foundation pela introgressão do retrotransposon de tabaco *Tnt1* (TADEGE et al., 2008). A linhagem 2HA é considerada isogênica à Jemalong (NOLAN; ROSE; GORST, 1989), e apresenta alta capacidade de embriogênese. Estudos transcricionais comparativos entre o genótipo 2HA e sua progenitora Jemalong durante a embriogênese somática *in vitro* identificaram 250 genes diferencialmente expressos (IMIN et al., 2008). Já a M9-10a é uma linhagem altamente embriogênica derivada por variação somaclonal *in vitro* de uma não-embriogênica M9 (SANTOS; FEVEREIRO, 2002), que também é geneticamente relacionada à linhagem Jemalong, possui alta capacidade embriogênica e disponibilidade de protocolo eficiente para manipulação genética (ARAÚJO et al., 2004).

Além da transformação via *Agrobacterium tumefaciens* por meio da embriogênese somática, dois outros métodos de transformação são utilizados em trabalhos com a leguminosa modelo *Medicago truncatula*, a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* por meio da organogênese (JAVOT; HARRISON, 2007; TRIEU; HARRISON, 1996) e transformação de raízes via *Agrobacterium rhizogenes* (COLLIER et al., 2005; CRANE et al., 2006). Considerando a disponibilidade de linhagens embriogênicas de origens conhecidas e protocolos eficientes para transformação genética, o *Medicago truncatula* se torna um sistema atraente para o desenvolvimento de estudos relacionados aos mecanismos moleculares da regulação gênica durante a embriogênese somática, bem como um sistema para estudos de genética funcional.

2.5 Estudo de mutantes

Os mutantes são indispensáveis para o estudo dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento e fisiologia das plantas. Um dos primeiros trabalhos em grande escala de produção de mutantes de *Medicago truncatula* foi desenvolvido pelo INRA-France (Institut National de la Recherche Agronomique) por meio de radiação gama. Neste trabalho foram selecionadas dezoito linhagens mutantes com relação à nodulação (SAGAN et al., 1995) e três (*dmi1*, *dmi3* e *sun1*) foram caracterizadas molecularmente (ENDRE et al., 2002; LEVY et al., 2004; SCHNABEL et al., 2005).

Diferente da mutagênese por raios gama, as mutações por elementos transponíveis em *Medicago truncatula* já estão bem avançadas, pois se faz possível identificar mutantes para diversos genes (genética reversa), tanto relacionados à fixação simbiótica de nitrogênio, quanto para outras características de importância biológica (TADEGE et al., 2008; TADEGE; RATET; MYSORE, 2005). Além disso, um grande número de genes já foi isolado por transformação genética, tanto que nos últimos dois anos mais de 20 genes foram caracterizados funcionalmente por meio do estudo de mutantes (Tabela 2).

Tabela 2 Genes caracterizados funcionalmente nos últimos 2 anos em *Medicago truncatula*

GENE(S)	FUNÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>NIP/LATD</i>	Transporte de nitrato;	Bagchi et al. (2012)
<i>ERN1</i> , <i>NSP1/NSP2</i>	Simbiose com bactérias do gênero <i>Rhizobium</i> ;	Cerri et al. (2012)
<i>ELP1</i>	Identidade do pulvino;	Chen et al. (2012)
<i>NAM</i>	Identidade dos órgãos florais e separação lateral das folhas;	Cheng et al. (2012)
<i>NOOT</i> e <i>COCH</i>	Identidade dos nódulos;	Couzigou et al. (2012)

<i>NFP, DMI3</i>	Reprogramação da expressão gênica dos hospedeiros por fungos micorrízicos arbusculares; organogênese dos nódulos;	Czaja et al. (2012) Rival et al. (2012)
<i>SBT1. 1</i>	Controle do tamanho da semente;	Erfurth et al. (2012)
<i>ANN3</i>	Controle da polaridade do crescimento dos pelos radiculares;	Gong et al. (2012)

“Tabela 2, conclusão”

GENE(S)	FUNÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>SUNN</i>	Número de nódulos; arquitetura da raiz; transporte de auxina entre caule e raiz;	Jin, Watt e Mathesius (2012)
<i>miR171h</i>	Colonização por fungos arbusculares micorrízicos;	Lauressergues et al. (2012)
<i>ENOD8</i>	Interação com bactérias do gênero <i>Rhizobium</i> ;	Meckfessel et al. (2012)
<i>WOX5</i>	Organogênese dos nódulos;	Osipova et al. (2012)
<i>PAR</i>	Biossíntese de proto-antocianidina;	Verdier et al. (2012)
<i>PLP</i>	Desenvolvimento do pulvino;	Zhou et al. (2012)
<i>DNF2</i>	Diferenciação do bacteroide e prevenção da senescência precoce do nódulo e de reações de defesa;	Bourcy et al. (2013)
<i>MtP5CS1, MtP5CS2 e MtP5CS3</i>	Produção de prolina induzida por estresse durante a fixação simbiótica de nitrogênio;	Kim e Nam (2013)
<i>STF</i>	Crescimento da lâmina foliar e desenvolvimento das flores;	Lin et al. (2013)
<i>FTa1</i>	Controle do tempo do florescimento;	Yeoh et al. (2013)

2.6 Mapa genético

O mapa genético é uma ferramenta poderosa para a compreensão da organização e evolução dos genomas. A espécie modelo *Medicago truncatula* tem um elevado grau de polimorfismo entre suas populações, o que facilita o estudo de características economicamente importantes.

Em um estudo recente a espécie modelo *Medicago truncatula* foi utilizada para detectar QTL (*quantitative trait locus*) para a qualidade de forragem (ESPINOZA; HUGUET; JULIER, 2012), pois estudos com espécies leguminosas forrageiras são limitados devido à ploidia complexa (geralmente tetraploide) e fecundação cruzada (alogamia). Outras características da planta também já foram estudadas por QTL (Tabela 3).

Tabela 3 Lista dos principais QTLs identificados em *Medicago truncatula*

CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
Características morfogênicas da parte aérea da planta (tempo de florescimento, comprimento dos ramos primários, comprimento do caule principal, ausência de ramos primários, ausência de ramos secundários, diâmetro dos ramos, taxa de alongamento dos ramos, matéria seca da parte aérea;	Julier et al. (2007) Espinoza, Huguet e Julier (2012)
Concentração e conteúdo de minerais nas sementes; peso médio das sementes;	Sankaram, Huguet e Grusak (2009)
Proteção do estelo das raízes ao fungo <i>Aphanomyces euteiches</i> ;	Djébali et al. (2009)
Massa, germinação, e crescimento heterotrófico das sementes; comprimento do hipocótilo;	Dias et al. (2010)
Correlação entre a razão sacarose/rafinose e o vigor da semente;	Vandecasteele et al. (2011)
Tolerância a seca;	Badri et al. (2011)
Resistência ao afídio do caupi;	Kamphuis, Gao e Singh (2012)
Controle do tamanho da semente;	Erfurth et al. (2012)
Defesa contra os afídios <i>Acrythosiphon pisum</i> (<i>pea aphid</i>) e <i>A. kondoi</i> (<i>bluegreen aphid</i>);	Guo et al. (2012)
Varição Simbiótica	Gorton et al. (2012)
Fixação de nitrogênio;	Moreau et al. (2012)
Tolerância a salinidade;	Arrauadi et al. (2012)

Qualidade da forrageira (conteúdo de proteína, digestibilidade, razão folha-caule); histologia do caule (área da secção transversal do caule, proporções dos tecidos); Espinoza e Julier (2012)
Controle do tempo do florescimento; Yeoh et al. (2013)

Além do estudo por meio de QTL, outra abordagem dos mapas genéticos é a genômica comparativa, que tem elucidado a estrutura, a estabilidade e evolução dos genomas das leguminosas (BERTIOLI et al., 2009; YOUNG; BHARTI, 2012; YOUNG et al., 2011).

2.7 Genômica funcional

O projeto *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA, <http://mtgea.noble.org/v3/>) é um banco de dados de genômica funcional (BENEDITO et al., 2008; HE et al., 2009) que possibilita o estudo da maioria dos genes em diferentes órgãos da planta (raízes, nódulos, caules, pecíolos, folhas, brotos vegetativos, flores, sementes e vagens de sementes), com desenvolvimento detalhado de séries temporais para os nódulos e sementes, utilizando o Affymetrix *Medicago* Chip Gene®. Esses dados foram complementados com dados de transcriptoma de plantas submetidas a vários tipos de estresses abióticos e bióticos e dados de células e tecidos específicos.

O serviço disponibilizado na web pelo banco MtGEA permite ao usuário identificar e analisar a expressão de genes de interesse, o que possibilita o estudo da expressão diferencial (Figura 2).

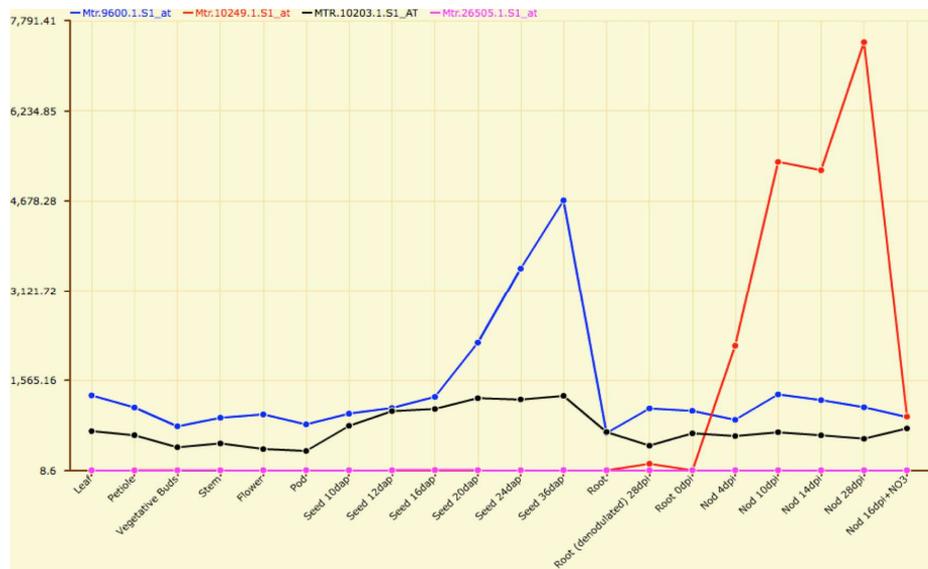


Figura 2 MtGEA: *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas - Noble Foundation (<http://mtgea.noble.org/v3>)

Nota: Demonstração utilizando apenas alguns órgãos da planta (BENEDITO et al., 2008) para quatro probesets: [Mtr.9600.1.S1_at](#), [Mtr.10249.1.S1_at](#), [MTR.10203.1.S1_AT](#), [Mtr.26505.1.S1_at](#).

2.8 Perspectivas

Espera-se que devido ao grande potencial genético e agrônômico da espécie modelo *Medicago truncatula*, aliado a todas as informações disponíveis para estudos genéticos, seja possível elucidar como funcionam e interagem as diversas rotas metabólicas de plantas leguminosas, no intuito de aplicar esse conhecimento no melhoramento de leguminosas economicamente importantes.

REFERÊNCIAS

ANÉ, J. M.; ZHU, H.; FRUGOLI, J. Recent advances in *Medicago truncatula* genomics. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2008, p. 1-11, Jan. 2008.

ARAÚJO, S. S. et al. An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 78, n. 2, p. 123-131, Aug. 2004.

ARRAOUADI, S. et al. QTL mapping of physiological traits associated with salt tolerance in *Medicago truncatula* Recombinant Inbred Lines. **Genomic**, San Diego, v. 99, n. 2, p. 118-125, Feb. 2012.

BAGCHI, R. et al. Functional assessment of the *medicago truncatula* nip/latd protein demonstrates that it is a high-affinity nitrate transporter. **Plant Physiology**, Washington, v. 160, n. 2, p. 906-916, Oct. 2012.

BAQUERIZO-AUDIOT, E.; DESPLANQUE, B.; PROSPERI, J. M. Characterization of microsatellite loci in the diploid legume *Medicago truncatula* (barrel medic). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 1, n. 1/2, p. 1-3, Mar. 2001.

BENEDITO, V. A. Time to crop: jumping from biological models to crop biotechnology. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 7, n. 1, p. 1-10, Apr. 2007.

BENEDITO, V. A. et al. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 504-513, Aug. 2008.

BERTIOLI, D. J. et al. An analysis of synteny of *Arachis* with *Lotus* and *Medicago* sheds new light on the structure, stability and evolution of legume genomes. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 45, p. 1-11, Jan. 2009.

BONNIN, I.; PROSPERI, J. M.; OLIVIERI, I. Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. **Genetics**, Austin, v. 143, n. 4, p. 1795-1805, Aug. 1996.

BOURCY, M. et al. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early

senescence and defense-like reactions. **New Phytologist**, Cambridge, v. 197, n. 4, p. 1250-1261, Mar. 2013.

BOUTILIER, K. et al. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 8, p. 1737-1749, Aug. 2002.

BRADI, M. et al. Quantitative trait loci associated with drought tolerance in the model legume *Medicago truncatula*. **Euphytica**, Wageningen, v. 181, n. 3, p. 415-428, Oct. 2011.

CERRI, M. R. et al. *Medicago truncatula* ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. **Plant Physiology**, Washington, v. 160, n. 4, p. 2155-2172, Dec. 2012.

CHAULET, E.; PROSPÉRI, J. M. Genetic diversity of *Medicago truncatula* Gaertn collected in Algeria. In: GENETIC RESOURCE SECTION MEETING OF EUCARPIA, 7., 1995, Clermont-Ferrand. **Proceedings...** Clermont-Ferrand: INRA, 1995. 1 CD-ROM.

CHEN, J. et al. Conserved genetic determinant of motor organ identity in *Medicago truncatula* and related legumes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 29, p. 11723-11728, July 2012.

CHENG, X. F. et al. No apical meristem (MtNAM) regulates floral organ identity and lateral organ separation in *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 195, n. 1, p. 71-84, July 2012.

COLLIER, R. et al. *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. **Plant Journal**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 449-457, Aug. 2005.

COUZIGOU, J. M. et al. NODULE ROOT and COCHLEATA maintain nodule development and are legume orthologs of Arabidopsis BLADE-ON-PETIOLE genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 11, p. 4498-4510, Nov. 2012.

CRANE, C. et al. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. **Planta**, Berlin, v. 223, n. 6, p. 1344-1354, May 2006.

CZAJA, L. F. et al. Transcriptional responses toward diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-Dependent reprogramming of host gene expression by arbuscular mycorrhizal fungal lipochitooligosaccharides. **Plant Physiology**, Washington, v. 159, n. 4, p. 1671-1685, Aug. 2012.

DELALANDE, M. et al. **Wild accessions/populations *Medicago truncatula* handbook**. Ardmore: The Samuel Roberts Noble Foundations, 2007. 27 p.

DIAS, P. M. B. et al. QTL analysis of seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures in *Medicago truncatula*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 122, n. 2, p. 429-444, Feb. 2011.

DJÉBALI, N. et al. Partial resistance of *medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 9, p. 1043-1055, Sept. 2009.

ELLWOOD, S. R. et al. SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 5, p. 977-983, Mar. 2006.

ENDRE, G. et al. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. **Nature**, London, v. 417, n. 6892, p. 962-966, June 2002.

ERFURTH, I. d' et al. A role for an endosperm-localized subtilase in the control of seed size in legumes. **New Phytologist**, Cambridge, v. 196, n. 3, p. 738-751, Nov. 2012.

ESPINOZA, L. D. E. L.; HUGUET, T.; JULIER, B. Multi-population QTL detection for aerial morphogenetic traits in the model legume *Medicago truncatula*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 124, n. 4, p. 739-754, Mar. 2012.

ESPINOZA, L. D. C. L.; JULIER, B. QTL detection for forage quality and stem histology in four connected mapping populations of the model legume *Medicago truncatula*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 126, n. 2, p. 497-509, Feb. 2012.

FENG, B. H. et al. Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNA induced by thidiazuron during somatic

embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 2, p. 176-182, Jan. 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. 508 p.

GONG, Z. Y. et al. Molecular studies of the *Medicago truncatula* MtAnn3 gene involved in root hair deformation. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 57, n. 15, p. 1803-1809, May 2012.

GORTON, A. J. et al. Mapping the genetic basis of symbiotic variation in legume-rhizobium interactions in *Medicago truncatula*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, Toronto, v. 2, n. 11, p. 1291-1303, Aug. 2012.

GUO, S. M. et al. Identification of distinct quantitative trait loci associated with defence against the closely related aphids *Acyrtosiphon pisum* and *A. kondoi* in *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 10, p. 13-22, Oct. 2012.

HAECKER, A. et al. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Cambridge, v. 131, n. 3, p. 657-668, Feb. 2004.

HE, J. et al. The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, n. 441, p. 1-9, Dec. 2009.

HECHT, V. et al. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, Washington, v. 127, n. 3, p. 803-816, Nov. 2001.

IMIN, N. et al. Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures. **BMC Plant Biology**, London, v. 8, n. 110, p. 1-14, Oct. 2008.

JAVOT, H.; HARRISON, M. J. Transformation and regeneration of Jemalong A17 through direct shoot organogenesis. *Medicago truncatula* handbook version. **Boyce Thompson Institute for Plant Research**, Ithaca, n. 14850, p. 25-34, 2007.

JIN, J.; WATT, M.; MATHESIUS, U. The autoregulation gene SUNN mediates changes in root organ formation in response to nitrogen through alteration of shoot-to-root auxin transport. **Plant Physiology**, Washington, v. 159, n. 1, p. 489-500, May 2012.

JULIER, B. et al. Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 8, p. 1391-406, May 2007.

KAMPHUIS, L. G.; GAO, L.; SINGH, K. B. Identification and characterization of resistance to cowpea aphid (*Aphis craccivora* Koch) in *Medicago truncatula*. **BMC Plant Biology**, London, v. 12, n. 101, p. 1-12, July 2012.

KIM, G. B.; NAM, Y. W. A novel Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene of *Medicago truncatula* plays a predominant role in stress-induced proline accumulation during symbiotic nitrogen fixation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 170, n. 3, p. 291-302, Feb. 2013.

LAURESSERGUES, D. et al. The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. **Plant Journal**, Oxford, v. 72, n. 3, p. 512-522, Nov. 2012.

LAUX, T. et al. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v. 22, n. 1, p. 87-96, Jan. 1996.

LAUX, T.; WURSCHUM, T.; BREUNINGER, H. Genetic regulation of embryonic pattern formation. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. S190-S202, 2004. Supplement.

LÉVY, J. et al. A Putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. **Science**, New York, v. 303, n. 5662, p. 1361-1364, Feb. 2004.

LIN, H. et al. Evolutionarily conserved repressive activity of WOX proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 1, p. 366-371, Jan. 2013.

MANTIRI, F. R. et al. The transcription factor MtSERF1 of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by Auxin plus Cytokinin in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, n. 4, p. 1622-1636, Apr. 2008.

MECKFESSEL, M. H. et al. Multiple domains in MtENOD8 protein including the signal peptide target it to the symbiosome. **Plant Physiology**, Washington, v. 159, n. 1, p. 299-310, May 2012.

MOREAU, D. et al. Using a physiological framework for improving the detection of quantitative trait loci related to nitrogen nutrition in *Medicago truncatula*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 124, n. 4, p. 755-768, Mar. 2012.

NOLAN, K. E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R. J. Characterisation of the legume SERK-NIK gene superfamily including splice variants: implications for development and defence. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 44, p. 44-60, Mar. 2011.

NOLAN, K. E.; ROSE, R. J.; GORST, J. R. Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis from regenerated plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 8, p. 278-281, 1989.

OSIPOVA, M. A. et al. WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN5 gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. **Plant Physiology**, Washington, v. 158, n. 3, p. 1329-1341, Mar. 2012.

PALOVAARA, J.; HAKMAN, I. WOX2 and polar auxin transport during spruce embryo pattern formation. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 4, n. 2, p. 153-155, Feb. 2009.

PIRES, A. S. et al. Integrated approaches to studying *Medicago truncatula* genome structure and function and their applications in biotechnology. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 30, n. 3, p. 1431-1442, Oct. 2012.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. **Advances in legume systematics: part 1**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. 1050 p.

RIECHMANN, J. L. et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**, New York, v. 290, p. 2105-2110, 2000. Supplement.

RIVAL, P. et al. Epidermal and cortical roles of NFP and DMI3 in coordinating early steps of nodulation in *Medicago truncatula*. **Development**, Cambridge, v. 139, n. 18, p. 3383-3391, Sept. 2012.

RUSSINOVA, E. et al. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3216-3229, Dec. 2004.

SAGAN, M. et al. Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after gamma ray mutagenesis. **Plant Science**, Shannon, v. 111, p. 63-71, Aug. 1995.

SANKARAN, R. P.; HUGUET, T.; GRUSAK, M. A. Identification of QTL affecting seed mineral concentrations and content in the model legume *Medicago truncatula*. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 119, n. 2, p. 241-253, July 2009.

SANTOS, D.; FEVEREIRO, P. Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 155-161, Aug. 2002.

SCHMIDT, E. D. et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, Cambridge, v. 124, n. 10, p. 2049-2062, May 1997.

SCHNABEL, E. et al. The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, n. 6, p. 809-822, Aug. 2005.

SHIBUKAWA, T. et al. Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot *LEC1* gene in its 5'-upstream region. **Gene**, Amsterdam, v. 437, n. 1/2, p. 22-31, May 2009.

SINGLA, B.; KHURANA, J. P.; KHURANA, P. Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 5, p. 833-843, May 2008.

SU, Y. et al. Auxin- induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 448-460, Aug. 2009.

- TADEGE, M. et al. Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. **Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 335-347, Apr. 2008.
- TADEGE, M.; RATET, P.; MYSORE, K. S. Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 229-235, May 2005.
- THAKARE, D. et al. The MADS-Domain transcriptional regulator *AGAMOUS-LIKE15* promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and *Soybean*. **Plant Physiology**, Washington, v. 146, n. 4, p. 1663-1672, Apr. 2008.
- THOMAS, M. R.; ROSE, R. J.; NOLAN, K. E. Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, n. 3, p. 113-117, Apr. 1992.
- TRIEU, A. T.; HARRISON, M. J. Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 1/2, p. 6-11, June 1996.
- VANDECASTEELE, C. et al. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 34, n. 9, p. 1473-1487, Sept. 2011.
- VERDIER, J. et al. MtPAR MYB transcription factor acts as an on switch for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 5, p. 1766-1771, Jan. 2012.
- WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v. 57, p. 443-462, 1986.
- YEOH, C. C. et al. Fine mapping links the FTa1 flowering time regulator to the dominant Spring1 Locus in *Medicago*. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 1-15, Jan. 2013.
- YOUNG, N. D.; BHARTI, A. K. Genome-enabled insights into legume biology. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 283-305, 2012.

YOUNG, N. D. et al. Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. **Nature**, London, v. 480, n. 7378, p. 520-524, Dec. 2011.

_____. Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, Washington, v. 137, n. 4, p. 1174-1181, Apr. 2005.

YOUNG, N. D.; UDVARDI, M. K. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 193-201, Apr. 2009.

ZHOU, C. N. et al. Identification and characterization of petiolule- like pulvinus mutants with abolished nyctinastic leaf movement in the model legume *Medicago truncatula*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 196, n. 1, p. 92-100, Oct. 2012.

ZIMMERMAN, L. J. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1411-1423, Oct. 1993.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 *Análise in silico e transcricional dos genes da subfamília de fatores de transcrição LEC2/ABI3 durante a embriogênese somática em *Medicago truncatula****

Horllys Gomes Barreto^{1,2}, Solange Aparecida Ságio¹, Antonio Chalfun-Júnior¹ e Vagner Augusto Benedito^{2*}

¹Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras Federal (UFLA), Lavras, MG, Brasil; ² Genetics and Developmental Biology, Plant and Soil Sciences Division, West Virginia University, Morgantown, WV, USA.

* **Autor correspondente:** vagner.benedito@mail.wvu.edu

Normalizado de acordo com o periódico *Plant Molecular Biology Reporter*

RESUMO

Para muitas espécies leguminosas, a embriogênese somática é uma etapa limitante em estudos envolvendo técnicas moleculares e de cultura de tecidos como a propagação clonal em larga escala, produção de sementes sintéticas, engenharia genética e melhoramento vegetal. Na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, foi observado que a subfamília de fatores de transcrição LEC2/ABI3 é composta pelos genes *LEC2*, *FUSCA3* e *ABI3*, os quais estão diretamente envolvidos nos processos de embriogênese zigótica e somática. Assim, com o intuito de melhor compreender o processo de embriogênese somática em espécies leguminosas, este trabalho teve como objetivo a identificação e análise do perfil de expressão dos genes da subfamília LEC2/ABI3 durante a embriogênese somática da planta modelo para espécies leguminosas *Medicago truncatula*. Por meio de análises *in silico*, foi possível identificar os genes *MtFUSCA3* e *MtABI3*. A identidade dos genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* foi confirmada por meio de alinhamento com seus genes homólogos previamente identificados e caracterizados em outras espécies. O perfil de expressão relativa por PCR em Tempo Real mostrou que os genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* podem estar diretamente envolvidos na regulação da embriogênese somática em *Medicago truncatula*.

Palavras-chave: Bioinformática • qPCR. • Planta modelo • Expressão gênica.

***In silico* and transcriptional analysis of the LEC2/ABI3 transcription factor subfamily genes during *Medicago truncatula* somatic embryogenesis**

ABSTRACT

For many leguminous species, somatic embryogenesis is considered as a limiting stage in studies involving molecular and plant tissue culture techniques, such as large scale clonal propagation, production of synthetic seeds, genetic engineering, and plant breeding. In the *Arabidopsis thaliana* model plant species, it has been shown that the LEC/ABI3 transcriptional factors subfamily is composed by the *LEC2*, *FUSCA* and *ABI3* genes, which are directly involved in zygotic and somatic embryogenesis processes. Thus, in order to better understand the somatic embryogenic process in leguminous species, this study aimed at identifying and analyzing the expression profile of the LEC/ABI3 subfamily genes during the somatic embryogenesis of the *Medicago truncatula* leguminous plant model species. The *in silico* analysis enabled the identification of genes *MtFUSCA3* and *MtABI3*. The identity of the genes *MtFUSCA3* and *MtABI3* was confirmed by means of sequence alignments with their homologous genes previously identified and characterized in other species. The relative expression profile performed by real-time PCR showing that the genes *MtFUSCA3* and *MtABI3* may be directly involved in *Medicago truncatula* somatic embryogenesis.

Keywords: Bioinformatics· qPCR· Model plant. Gene expression.

Introdução

A embriogênese somática em plantas é o processo pelo qual células diferenciam-se embriões, reproduzindo o que normalmente acontece durante o desenvolvimento das sementes, entretanto, sem a união sexual dos gametas (Zimmerman 1993). Esse processo já foi extensivamente estudado em níveis morfológicos e fisiológicos (Laux et al. 2004; George et al. 2008). Com relação aos mecanismos genéticos, a metilação do DNA parece ter um efeito importante (Santos e Fevereiro 2002; Shibukawa et al. 2009), enquanto que os componentes genéticos envolvidos na embriogênese, como os genes que codificam para proteínas regulatórias ou que fazem parte de cascatas de sinais de indução e de desenvolvimento dos embriões somáticos estão sendo estudados (Nolan et al. 2011).

Entre as proteínas regulatórias envolvidas no processo de embriogênese somática, estão os fatores de transcrição pertencentes à superfamília B3, que controlam a expressão de genes envolvidos no controle do desenvolvimento do embrião (Suzuki e McCarty 2008). A superfamília B3 foi inicialmente estudada em milho e é composta pelas famílias LAV, RAV, ARF e REM (Swaminathan et al. 2008). O domínio B3 tem em torno de 100 resíduos de aminoácidos (Suzuki et al. 1997).

Apenas a família LAV exerce um papel fundamental na embriogênese somática. Esta família já foi bem caracterizada funcionalmente em *Arabidopsis thaliana*, sendo composta por duas subfamílias LEC2/ABI3 e VAL, e tem um total de seis genes pertencentes à família no genoma de *Arabidopsis*, sendo três genes para cada subfamília, os genes *LEC2*, *FUS3* (*FUSCA3*) e *ABI3* que estão envolvidos com a embriogênese zigótica e somática para a subfamília LEC2/ABI3 (Parcy et al. 1997; Stone et al. 2001; Santos-Mendoza et al. 2008; Le et al. 2010; Ledwon e Gaj 2011), e os genes *VAL1*, *VAL2*, e *VAL3*, que estão envolvidos com o desenvolvimento vegetativo e percepção da sinalização de açúcares (Tsukagoshi et al. 2005; Suzuki et al. 2007; Tsukagoshi et al. 2007).

Quanto à função dos genes da subfamília LEC2/ABI3, Stone et al. (2001) demonstraram que a superexpressão de *LEC2* induz o desenvolvimento de embriões somáticos. Outros estudos indicam que a mutação do gene *LEC2* prejudica a resposta à embriogênese somática *in vitro* (Gaj et al. 2005) e que o padrão de expressão diferencial dos níveis de *LEC2* durante a indução da embriogênese somática é elevado (Ledwon e Gaj 2009), elevando os níveis de auxina endógena (Stone et al. 2008).

Diferentemente do *LEC2*, os genes *FUS3* e *ABI3* são poucos estudados quanto ao papel na embriogênese somática, por outro lado são bem conhecidos quanto à embriogênese zigótica. A proteína FUS3 desempenha um papel central na maturação da semente (Luerssen et al. 1998), por meio da regulação negativa

dos fito-hormônios GA e etileno (Curaba et al. 2004; Gazzarrini et al. 2004; Lumba et al. 2012), e positiva do ABA (Gazzarrini et al. 2004), além do controle de síntese e armazenamento de proteínas e lípidos durante a fase de maturação da embriogênese zigótica (Kagaya et al. 2005a). Quanto à embriogênese somática, foi observado recentemente que o gene *FUS3* apresenta maiores níveis de expressão para calos embriogênicos em comparação a calos não-embriogênicos (Ledwon e Gaj 2011). Além disso, o gene *FUS3* é ativado pelos genes *LEC1* e *LEC2* que tem participação direta na embriogênese somática (Kagaya et al. 2005b; Stone et al. 2008).

Já o *ABI3* está envolvido na diferenciação dos plastídios, formação de raízes laterais, e dormência de sementes (McCarty 1995; Rohde et al. 2000; Brady et al. 2003) e assim como o gene *FUS3*, também é regulado positivamente pelo gene *LEC2* durante a maturação de sementes (To et al. 2006).

Embora a subfamília *LEC2/ABI3* já tenha sido extensivamente estudada em *Arabidopsis thaliana*, informações sobre a regulação genética dos genes dessa subfamília em leguminosas são escassas, principalmente com relação à embriogênese somática. Para muitas espécies leguminosas, a embriogênese somática é uma etapa limitante em estudos envolvendo técnicas moleculares e de cultura de tecidos, como a propagação clonal em larga escala, produção de sementes sintéticas, engenharia genética e melhoramento vegetal. Assim, o

objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar a subfamília LEC2/ABI3 durante a embriogênese somática em *Medicago truncatula*.

Material e Métodos

Análise in silico

As sequências dos genes da subfamília LEC2/ABI3 foram identificadas por meio do BLAST de sequências dos genes da superfamília B3 disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) contra o banco de dados de ESTs (Mt3.5v4_cds e Mt3.5v4_pep) de *Medicago truncatula*, disponibilizado no portal da Samuel Roberts Noble Foundation (Zhao Bioinformatics Laboratory 2013).

As sequências de nucleotídeos de interesse foram comparadas com as sequências de proteínas de banco de dados públicos (NCBI) utilizando-se o algoritmo BLASTx. Para classificar a parte funcional da proteína, bem como sua matriz de leitura, foi utilizada a ferramenta ORF FINDER (Open Reading Frame Finder). O alinhamento da sequência da proteína de interesse com as proteínas disponíveis no NCBI foi realizado por meio do algoritmo BLASTp (Altschul et al. 1997).

Análise filogenética

O alinhamento das sequências foi feito pelo programa ClustalW (Thompson et al. 1994) com os parâmetros padrões (default), utilizando-se as sequências de nucleotídeos traduzidas em aminoácidos. A árvore final foi feita utilizando-se o programa MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007), com o modelo de comparação Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987), método de distância p e supressão pair-wise. A validade da árvore quanto à distância filogenética dos clusters foi medida pelo teste probabilístico de bootstraps, originado de 10.000 replicatas.

Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Funcional de Plantas da West Virginia University (WVU-USA). As sementes das linhagens M9-10a e M9 foram escarificadas e esterilizadas. A etapa de escarificação foi realizada em capela de exaustão, onde após imersão das sementes em ácido sulfúrico concentrado por 10 min, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada fria (4 °C). Em seguida as sementes foram levadas para fluxo laminar, e esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente (10 µL/L de Tween 20) durante 10 min, e lavadas quatro vezes com água destilada autoclavada.

Após as etapas de escarificação e esterelização, as sementes foram colocadas em placas de Petri com papel de filtro autoclavado, e em seguida semeadas em frasco (1 semente/frasco) contendo 40 mL de meio com sais MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com 3% de sacarose e 0,7% de agar. O pH do meio de cultura foi corrigido para 5,8 com KOH 0,1 M antes da adição de agar e autoclavagem. Os frascos foram mantidos durante três dias a 4 °C no escuro, em seguida foram transferidos para uma câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 24/22 °C (dia/noite) e intensidade luminosa de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida de lâmpadas brancas fluorescentes.

Aos 45 dias de cultivo, folhas completamente expandidas (explantes) foram coletadas e submetidas a cultivo *in vitro* em placas de Petri com 25 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de agar, 0,2 mg/L de zeatina, 0,1 mg/L de 2,4-D e incubadas em regime de 16 h de fotoperíodo e irradiância de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 24 °C até a coleta do material. Os calos que proliferaram nas margens dos cortes das folhas foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o isolamento do RNA.

Foram utilizadas três repetições biológicas para cada amostra, sendo 10 tempos de cultivo (0, 2, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 240, 336 horas) e duas linhagens [M9-10a, embriogênica e M9, que apresenta um baixo potencial embriogênico, e produzem essencialmente calos não-embriogênicos (Santos e Fevereiro 2002)]

em um delineamento inteiramente casualizado. Cada repetição biológica foi constituída por um conjunto de três placas de Petri com cinco explantes (segmentos foliares) por placa.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído utilizando-se o kit mirVana (Ambion), seguindo as recomendações do manual para isolamento de RNA total. Em seguida, as amostras foram tratadas com o inibidor Turbo DNA-free Kit (Ambion), para eliminação de DNA residual. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose a 1%. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000). As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram usadas para a síntese de cDNA com o SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). Após a síntese de cDNA as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

PCR em tempo real

A partir das sequências dos genes putativos *MtFUSCA3* (*FUS3*) e *MtABI3* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3*) de *Medicago truncatula* que foram obtidas do estudo *in silico*, foram desenhados os primers para qPCR (Tabela 1) utilizando o programa Primer Express v2.0 da Applied Biosystems.

Para a análise da expressão gênica quantitativa por qPCR foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando SYBR Green e o cDNA obtido a partir de RNA extraído de segmentos foliares (explantos) dos 10 tempos em estudo. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95 °C. Os dados foram coletados e armazenados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1).

Para cada reação foram utilizados 1,0 µL de cDNA (diluído 1:5), 0,2 µL de cada primer a 10 µM e 5,0 µL de Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen) para um volume final 10,0 µL/reação. As amostras foram processadas em triplicatas técnicas e os resultados normalizados usando CTs (Ciclo Threshold) obtidos pela expressão dos genes endógenos, *ACTINA* (*β-actin*), *UBIQUITINA* e *HELICASE*. O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (threshold). O método que foi usado é o do CT comparativo (Pfaffl 2001).

Para usar o método CT comparativo foi realizado um experimento para validação dos primers, ou seja, comprovar que os primers apresentam uma alta eficiência (Tabela 1). Para isso foram realizadas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Este procedimento também permitiu a definição da melhor diluição do cDNA.

Tabela 1 *Primers* utilizados na qPCR (MtFUSCA3, MtABI3).

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Eficiência (%)
MtFUSCA3 F	5' GTGGTTTCATGGCAGGTGTTGA 3'	93
MtFUSCA3 R	5' GTTGACCCGACCCGTTGTT 3'	
MtABI3 F	5' GGTGGTGGAAAAGAAGGGATGAA 3'	90
MtABI3 R	5' GGTATTATTGTGTTTCGTGTTGGCGTT 3'	
ACTINA F	5' TCAATGTGCCTGCCATGTATGT 3'	91
ACTINA R	5' ACTCACACCGTCACCAGAATCC 3'	
UBIQUITINA F	5' CTGACAGCCCACTGAATTGTGA 3'	93
UBIQUITINA R	5' TTTTGGCATTGCTGCAAGC 3'	
HELICASE F	5'GTACGAGGTCGGTGCTCTTGAA 3'	99
HELICASE R	5'GCAACCGAAAATTGCACCATAC 3'	

Resultados e Discussão

Indução da Embriogênese Somática

O desenvolvimento embriogênico das duas linhagens estudadas demonstrou-se diferente, embora fossem submetidas às mesmas condições experimentais. Após 288 horas de cultivo dos explantes foliares, a linhagem M9-10a começou a formar massas embriogênicas, enquanto que a M9 continuou formando calos não embriogênicos, e os explantes entraram em senescência (Figura 1).

O processo de indução da embriogênese somática para as linhagens M9 e M9-10a foi descrito por Santos e Feveireiro (2002), que demonstraram a alta capacidade embriogênica da linhagem M9-10a desde a formação do embrião até a o desenvolvimento da planta em comparação com a linhagem M9.

Almeida et al. (2012) por meio do estudo da proteômica das linhagens M9-10a e M9 durante o processo de indução, expressão e desenvolvimento de embriões somáticos, identificaram 136 proteínas diferencialmente entre as duas linhagens. Além disso, observaram que há formação de massas embriogênicas na segunda semana de cultivo dos explantes foliares, como observado no presente trabalho (Figura 1).

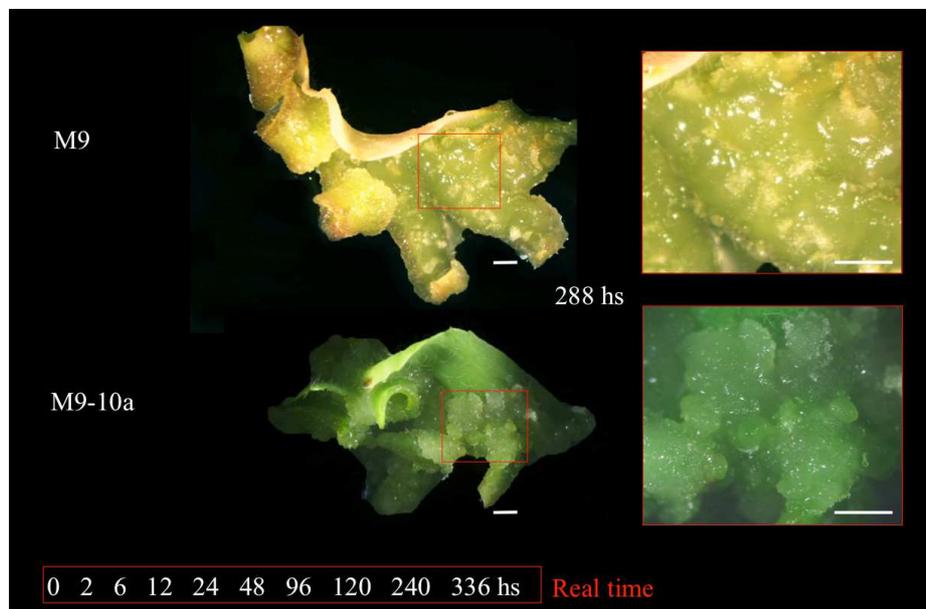


Figura 1 Comparação da indução da embriogênese somática entre a linhagem embriogênica “M9-10a” e não embriogênica “M9” na planta modelo *Medicago truncatula*. Barra = 1 mm.

Análises filogenéticas

A busca por possíveis homólogos dos genes da subfamília LEC2/ABI3 no banco de dados da espécie *Medicago truncatula* (Zhao Bioinformatics Laboratory 2013) gerou um total de 107 sequências com similaridade confiável ($e\text{-value} < 10^{-4}$) para o domínio B3, sendo que dessas, as 83 sequências mais próximas da subfamília LEC2/ABI3 foram utilizadas nas análises filogenéticas (Figura 2).

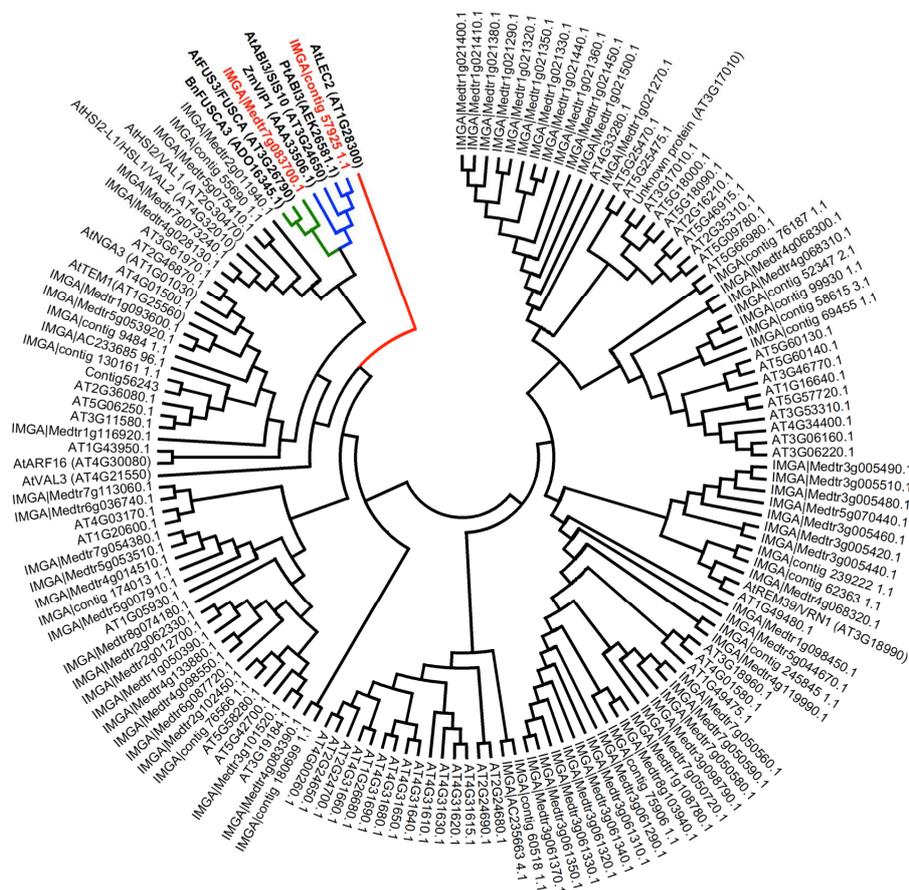


Figura 2 Árvore filogenética relacionando as seqüências putativas dos genes da subfamília LEC2/ABI3 relacionadas com a embriogênese somática em *Medicago truncatula*, e as proteínas da família B3 de *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Populus tremula* e *Zea mays* publicados e depositados no NCBI. Foi utilizado o modelo de comparação *Neighbor-joining*, pelo método de distância p e supressão *pair-wise*.

A análise destas seqüências possibilitou a identificação de duas seqüências da família LEC2/ABI3, classificadas como genes *MtFUSCA3*

(IMGALMedtr7g083700.1) e *MtABI3* (IMGALcontig 57925.1) por meio da comparação com outras espécies (Figura 2).

O gene *MtFUSCA3* foi agrupado no mesmo clado que o *FUSCA3* de *Arabidopsis thaliana* e *Brassica napus* (Figura 2), além de possuir uma ORF de 945pb, que codifica para uma proteína de 314 aminoácidos, um tamanho de proteína similar ao *FUSCA3* de *Arabidopsis thaliana* que codifica para uma proteína de 313 aminoácidos (Figura 3).

A partir do alinhamento com a sequência do *AtFUSCA3* observa-se uma identidade de 47% para a sequência completa da proteína e 79% para o domínio B3 característico da família (Figura 3).

```

MtFUSCA3 : MMMDEGEGRKVVYQKTEACCFMAGVEDELGFVNVKGDNNNGSQRIHHDHGFVAAAFGT : 60
AtFUSCA3 : MMVDENVETRASTIVSVDHCFGS-----CSGHHHGLSASVPLLCV : 42

MtFUSCA3 : VRKKRRMRQRRSSSSTITHLKNLPSSTTTTTTTTTSHVEISFIPLFFSLPARELDH : 120
AtFUSCA3 : NWKKRRMRQRRSSSENLSFP-----FPMPISHVPPLPARRLLP : 85

                                Domínio B3

MtFUSCA3 : RRLRFLFQKELKNSDVSSLRRMVLPKAEAELPLESKEGILSMDLDGLHVSFKYR : 180
AtFUSCA3 : RKLRFLFQKELKNSDVSSLRRMLPKAEAELPLECKEGILRMDLDGEHVTFKYR : 145

MtFUSCA3 : FWPNNSRMYVLENTGDFVSTHGLREGDSIMVYQDNQNNYVIQARKACTD----- : 232
AtFUSCA3 : YWPNNSRMYVLENTGDFVNAHGLQLGDSIMVYQDLYSNNYVIQARKASEEEVDVINLE : 205

MtFUSCA3 : -----EYMEANTINHIFVDYEVNKSCFDVAYEAMNDIS---MSFI : 272
AtFUSCA3 : EDDVYTNLRIENTVVNDLLCDENHHNNNNNSNSNSNKCSYYFVIDVTNTESFV : 265

MtFUSCA3 : YDTIS---NDSPLDFLGSMN---YSRIGSVETFGSVENISLDDFY : 314
AtFUSCA3 : YDTALTSNDTPLDFLGGHTTTNNYSRFGAFDGLGSVENISLDDFY : 313

```

Figura 3 Comparação das sequências putativas de aminoácidos dos genes *MtFUSCA3* com o *FUSCA3* de *Arabidopsis thaliana*. O alinhamento foi gerado pelo programa Clustal W e exibido pelo Gene Doc. Resíduos de aminoácidos idênticos são sombreados em preto e os resíduos não conservados em cinza. Os traços inseridos nas sequências indicam espaços inseridos para a otimização do alinhamento e a barra vermelha indica a posição do domínio B3. Posições de aminoácidos são apresentadas no lado direito.

A proteína MtABI3 foi agrupada em um clado com o *ABI3* de *Arabidopsis thaliana*, *Populus tremula* e *Zea mays* (Figura 2), com máxima identidade de sequência de 46%, 53% e 54% respectivamente. O MtABI3 apresenta os domínios B1, B2 e B3 característicos de ABI3, com identidades de 79%, 78% e 94%, respectivamente, quando comparados com os domínios de *Arabidopsis* (Figura 4).

MtABI3 : -----MECGLDLHAKLVNTEQVGFGNLAEFNWLNNNTNCDGDLGGMN--- : 44
 AtABI3 : MKSLHVAANAGDLAEDCGILGCDADITVLMDCIDEVGFETWLDHGGDNNHVHGHQDDDL : 60

MtABI3 : -MNDPASMFYEDREELPDFPCMSSSSSSSSTPLKTIAGTSTTTTSSSSSSSSSSAA : 103
 AtABI3 : EVHFDLSIFYGDFELPDFPCMSSSSSSSSTSPAPVNAIVSS----ASSSSAASSTSSAA : 116

MtABI3 : SWAVLKSDVEVDHQGYQKHGHELDYHHGHEPTLSSSTASMEISQQCCQLIGVSNNDVVVG : 163
 AtABI3 : SWAILRSDGDDPTE---NQNQYASGNCDDSSGALCSTASMEIPLDSSCGFGCGE-----C : 168

MtABI3 : GGDCMDVNMIMTFGYMLLEANEFFDPASTFQNEDEENPLVDFTQEQVQVQDGYQQHQ : 223
 AtABI3 : GGDCID---MMETFGYMLLDSNEFFDTSATFQCID----- : 201

MtABI3 : VPMIVHIDRENKPPQVNIENNDVHVCQGVNGEESIQQDEIGACDGVSDDESMVFLEWL : 283
 AtABI3 : -----DTQNPNLMDQTLERQEDQVVVPMENNSGGDMQMMNSLEQDDLEAVFLEWL : 254

Domínio B1

MtABI3 : KSNKLSVSAIDLNVKLRKSTIESAARRLGGGKEMKQLLKLILEWVQTSHLHNKRKLEN : 343
 AtABI3 : KSNKLTVSAEDLRVVKIKKATIESAARRLGGGKEMKQLLKLILEWVQTNHLQRRRTTT- : 313

MtABI3 : ANNTLIPSNIVPQCHHFQDFCCNONTANTFAEFESNACFNCTSWIDQTELVIPPPQFSQP : 403
 AtABI3 : --TTLNLSYQQSEQCDFQCNENPNN--NLIPESDQTCFSESTWVPPPEQQ----- : 361

MtABI3 : MVGVGVGFVDEPYTNGSVSNINPYCPAVTNEYHMLSEHNSWGSQFNVAENYNQSEVEN : 463
 AtABI3 : -----AFVSDPFGF----YMPAPNYPQPPEFLHLESPESWPPPEQ-SGMPHQCFEMP : 410

Domínio B2

MtABI3 : NNNVLQEHGMNEGGYGNQYNSYCLFPGEG----DRLMRLGESATKEARKKRMARQRREF : 518
 AtABI3 : PTSQYNQEGDPTGFNCYNNNEYQYPYVPEAGQMRDCRLRLCSSLATKEARKKRMARQRREF : 470

MtABI3 : SHHREHNNHHQNIQGSDFLANLGSQDSCIN--VAAGGSEANPANWMYWQIMTGGTFAST : 576
 AtABI3 : SHHREHNNNNNNNNQONQCTQIGETCAAVAPCINPVATHTTGGTWMYWENVE----AVP : 526

MtABI3 : AEVVPAAEPTCEFEVDRDRFTMQTQSSHCGRSASDRRQGWKPEKNLRFLLQKVLKQSDVGS : 636
 AtABI3 : PCEFEVMEPTCEFTMDRAGSASAMPRQC--VVEDRRQGWKPEKNLRFLLQKVLKQSDVGNL : 584

Domínio B3

MtABI3 : GRIVLPKKEAETHLPELEARDGISITMEDIGTSRVWNMRYRYWPNKSRMYLLENTGDFV : 696
 AtABI3 : GRIVLPKKEAETHLPELEARDGISIAMEDIGTSRVWNMRYRFWPNKSRMYLLENTGDFV : 644

MtABI3 : KANGLQEGDFIVIYSDVKCGKFMIRGVKVRCCGTKPEAKKAGKSQKNQHGNNAAANLATA : 756
 AtABI3 : KANGLQEGDFIVIYSDVKCGKYLIRGVKVRCCPSGCKPEAPPSSAATKRQNKSRNNNS : 704

MtABI3 : VDNNGTPESSPKRKK-- : 770
 AtABI3 : PSANVVVASPTSQTVK : 720

Figura 4 Comparação das prováveis sequências de aminoácidos dos genes MtABI3 com o ABI3 de *Arabidopsis thaliana*. O alinhamento foi gerado pelo programa Clustal W e exibidos com Gene Doc. Resíduos de aminoácidos idênticos são sombreados em preto e os resíduos não conservados em cinza. Os traços inseridos nas sequências indicam espaços inseridos para a otimização do alinhamento e as barras verde, azul e vermelha indicam os domínios B1, B2 e B3, respectivamente. Posições de aminoácidos são apresentadas no lado direito.

Esses dados corroboram com os resultados de Swaminathan et al. (2008) que demonstraram que os genes *AtFUSCA3* e *AtABI3* da subfamília LEC2/ABI3, tem o domínio B3, sendo que o segundo ainda apresenta os domínios B1 e B2. Os resultados apresentados complementam o trabalho realizado por Wang et al. (2012), que caracterizou o domínio B3 em onze espécies, identificou 93 genes com domínio B3 e apenas um gene da subfamília LEC2/ABI3 em *Medicago truncatula*, enquanto com o presente trabalho identificaram-se 107 sequências com domínio B3 e apresentam-se os prováveis homólogos dos genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* da subfamília LEC/ABI3.

Expressão Gênica

Por meio da análise da expressão relativa dos genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* da subfamília LEC2/ABI3 foi possível observar um padrão de expressão semelhante, com o aumento nos níveis de expressão para a linhagem M9-10a a partir de 240 horas de cultivo, atingindo os maiores níveis de expressão com 336 horas de cultivo (Figura 5).

Quando os genes foram analisados individualmente, observou-se que o *MtFUSCA3* apresenta uma expressão basal para as duas linhagens avaliadas até 120 horas de cultivo *in vitro*, porém, houve um aumento nos níveis de expressão em 20 vezes na linhagem M9-10a com 240 horas de cultivo *in vitro*, chegando a um máximo de 120 com 336 horas de cultivo quando comparado com o genótipo M9 (Figura 5).

Swaminathan et al. (2008) analisaram o padrão de expressão do *AtFUSCA3*. Os resultados relatados mostram um nível basal de expressão em folhas, enquanto os maiores níveis de expressão foram encontrados em sementes, indicando um papel semelhante nos programas de desenvolvimento embrionário tanto zigótico como somático. Essa questão foi levantada por Braybrook et al. (2006) durante os estudos do gene *LEC2* de *Arabidopsis thaliana*, que também desenvolve um papel fundamental no desenvolvimento embrionário zigótico e somático. Além disso, o gene *LEC2* é responsável pela regulação positiva do *FUSCA3* como foi observado por Stone et al. (2008).

O gene *MtABI3* não apresentou expressão até 6 horas de cultivo *in vitro* para as linhagens em estudo, sendo que a partir das 12 horas de cultivo, apresentou níveis de expressão basal que se seguiu até as 120 horas, e às 240 horas de cultivo já apresentava níveis de expressão 240 vezes maior para a linhagem M9-10a em comparação com o controle, com um máximo de expressão de 1500 vezes mais as 336 horas de cultivo.

Esse resultado corrobora com os obtidos por Swaminathan et al. (2008), que observaram que o gene *AtABI3* apresenta padrão de expressão em sementes e não é expresso em folhas. Isso sugere que o gene *MtABI3* é ativado nos períodos iniciais da indução da embriogênese somática. Além disso, o *ABI3* também é regulado positivamente pelo gene *LEC2* durante a maturação de sementes (To et al. 2006).

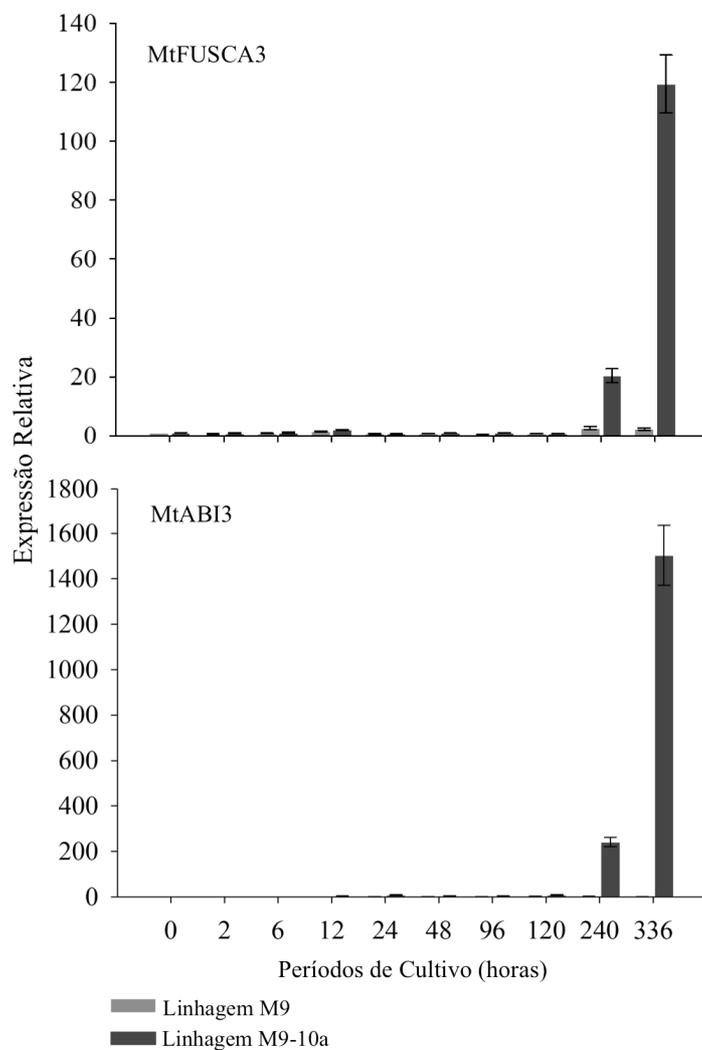


Figura 5 Perfil da expressão por qPCR dos genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* durante o período de indução da embriogênese somática de 336 horas de cultivo, para explantes foliares da linhagem altamente embriogênica M9-10a e uma com baixa capacidade embriogênica M9 de *Medicago truncatula*. O eixo x representa os períodos de cultivo dos explantes foliares em meio de sais MS com 3% de sacarose, 0,7% de agar, 0,2 mg/L de zeatina, 0,1 mg/L de 2,4-D e o eixo y representam a expressão relativa. As barras de erro representam o

desvio de três replicatas biológicas. Cada dado foi normalizado pela média dos valores de expressão dos genes de referência *ACTINA* (β -*actin*), *UBIQUITINA* e *HELICASE*. A amostra normalizadora para os genes *MtFUSCA* e *MtABI3* foi os explantes foliares do tempo 0 e 12 horas de cultivo para linhagem M9, respectivamente.

Conclusão

Este estudo possibilitou a identificação e caracterização transcricional dos genes *MtFUSCA3* e *MtABI3* da subfamília LEC/ABI3, que parecem estar envolvidos na regulação da embriogênese somática em *Medicago truncatula*. Estudos complementares com mutantes possibilitarão uma maior compreensão dos processos regulatórios bem como da função específica desses genes durante a indução da embriogênese somática e desenvolvimento do embrião.

Referências

Almeida AM, Parreira JR, Santos R, Duque AS, Francisco R, Tomé DF, Ricardo CP, Coelho AV, Fevereiro P (2012) A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiol Plantarum* 146:236-249

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res*, 25:3389-3402

Brady SM, Sarkar SF, Bonetta D, McCourt P (2003) The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis. *Plant J* 34:67-75

Braybrook SA, Stone SL, Park S, Bui AQ, Le BH, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2006) Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3468-3473

Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M, Vachon G (2004) AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136:3660-3669

Gaj MD, Zhang S, Harada JJ, Lemaux PG (2005) LEAFY COTYLEDON genes are essential for induction of somatic embryogenesis of Arabidopsis. *Planta* 222:977-988

Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P (2004) The transcription factor FUSCA3 controls development timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell* 7:373-385

George EF, Hall MA, de Klerk GJ (2008). *Plant propagation by tissue culture*, 3rd edn. Springer, Dordrecht

Kagaya Y, Okuda R, Ban A, Toyoshima R, Tsutsumida K, Usui H, Yamamoto A, Hattori T (2005a) Indirect ABA-dependent regulation of seed storage protein genes by FUSCA3 transcription factor in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 46:300-331

Kagaya Y, Toyoshima R, Okuda R, Usui H, Hattori T (2005b) LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of

FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant Cell Physiol* 46:399-406

Laux, T, Würschum T, Breuninger H (2004) Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* 16:S190-S202.

Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews GN, Fischer RL, Okamuro JK, Harada JJ, Goldberg RB (2010) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8063-8070

Ledwon A, Gaj EMD (2009) LEAFY COTYLEDON2 gene expression and auxin treatment in relation to embryogenic capacity of Arabidopsis somatic cells. *Plant Cell Rep*, 28:1677

Ledwon A, Gaj EMD (2011) LEAFY COTYLEDON1, FUSCA3 expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Growth Regul* 65:157-167

Luerssen H, Kirik V, Herrmann P, Miséra S (1998) FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/AB13-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 15:755-764

Lumba S, Tsuchiya Y, Delmas F, Hezky J, Provar NJ, Lu QS, McCourt P, Gazzarrini S (2012) The embryonic leaf identity gene FUSCA3 regulates vegetative phase transitions by negatively modulating ethylene-regulated gene expression in Arabidopsis. *BMC Biology* 10:8-10

McCarty DR (1995) Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annu Rev Plant Biol* 46:71-93

Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol* 15:473-479

Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2011) Characterisation of the legume SERK-NIK gene superfamily including splice variants: implications for development and defence. *BMC Plant Biology* 11:44-60

Parcy F, Valon C, Kohara A, Miséra S, Giraudat J (1997) The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3, and LEAFY COTYLEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *Plant Cell* 9:1265-1277

- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 29(9):40-45
- Rohde A, De Rycke R, Beeckman T, Engler G, Van Montagu M, Boerjan W (2000) ABI3 affects plastid differentiation in dark- grown Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* 12:35-52
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Santos D, Fevereiro P (2002) Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 70:155-161.
- Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. *Plant J* 54:608-620
- Shibukawa T, Yazawa K, Kikuchi A, Kamada H (2009) Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot *LECI* gene in its 5'-upstream region. *Gene* 437:22-31
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong LW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh TF, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2008) Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3151-3156
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11806-11811
- Suzuki M, Kao CY, McCarty DR (1997) The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* 9:799-807
- Suzuki M, McCarty DR (2008) Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Curr Opin Plant Biol* 11:548-553
- Suzuki M, Wang HH, McCarty DR (2007) Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiol* 143:902-911

- Swaminathan K, Peterson K, Jack T (2008) The plant B3 superfamily. *Trends Plant Sci* 13:647-655
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis: software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24:1596-1599
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673-4680
- To A, Valon C, Savino G, Guilleminot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F (2006) A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *Plant Cell* 18:1642-1651
- Tsukagoshi H, Morikami A, Nakamura K (2007) Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:2543-2547
- Tsukagoshi H, Saijo T, Shibata D, Morikami A, Nakamura K (2005) Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol* 138:675-685
- Wang Y, Deng D, Zhang V, Wang S, Bian Y, Yin Z (2012) Systematic analysis of plant-specific B3 domain-containing proteins based on the genome resources of 11 sequenced species. *Mol Biol Rep* 39:6267-6282
- Zhao Bioinformatics Laboratory (2013) BLAST against NT. IOP Publishing Web. <http://bioinfo3.noble.org/doblast>. Acessado 10 fev. 2013.
- Zimmerman LJ (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423

“VERSÃO PRELIMINAR”

ARTIGO 2 **Caracterização dos genes tipo MICK da família MADS-box em *Medicago truncatula* durante a embriogênese somática in vitro**

Horllys Gomes Barreto¹, Solange Aparecida Ságio¹, Antonio Chalfun-Júnior¹ e Vagner Augusto Benedito^{2*}

¹Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras Federal (UFLA), Lavras, MG, Brasil; ²Laboratory of Plant Functional Genetics, Plant and Soil Sciences Division, West Virginia University (WVU), Morgantown, WV, USA.

* **Autor correspondente:** vagner.benedito@mail.wvu.edu

Normalizado de acordo com o periódico *Plant Physiology*

RESUMO

Os genes *MADS-box* do tipo MIKC constituem uma das principais famílias de fatores de transcrição em plantas. Esses genes estão diretamente envolvidos em vários processos do desenvolvimento de plantas, principalmente na embriogênese somática, que se coloca como um processo limitante para procedimentos biotecnológicos. O objetivo com este trabalho foi analisar o papel dos genes *MADS-box* do tipo MIKC durante a embriogênese somática de *Medicago truncatula*. A identificação dos 24 genes *MADS-box* do tipo MIKC foi realizada por meio de análises *in silico* na base de dados IMGAG (*International Medicago Genome Annotation Group*) v.3.5. A confirmação da identidade dos genes encontrados foi feita por meio do alinhamento das sequências obtidas com genes *MADS-box* do tipo MIKC previamente identificados em outras espécies. Análises da expressão gênica, as quais foram realizadas por PCR em tempo real, RNAseq e microarranjos, sugerem que os genes *MtSVPa* (Medtr5g032520.1), *MtSVPb* (Medtr5g032150.1), *MtSVPc* (Medtr4g093970.1), *MtAGL24* (Medtr5g066180.1), *MtSOC.1* (Medtr7g075870.1), *MtAP3a* (Medtr3g113030.1), *MtAP3b* (Medtr5g021270.1), *MtAGL21.1* (Medtr5g031000.1) e *MtAGL21.2* (Medtr 5g031000.2) estão diretamente envolvidos na regulação da embriogênese somática em *Medicago truncatula*. *MtAGL21.1*, *MtAGL21.2* e *MtSOC.1* que apresentaram padrão de expressão diferencial para linhagens embriogênicas (M9-10a e 2HA) quando comparadas com as linhagens-controles não-embriogênicas ou pouco embriogênicas (M9 e Jemalong). A caracterização funcional desses genes pode ajudar a desvendar os componentes genéticos responsáveis pelo processo de embriogênese somática em *Medicago truncatula*.

Palavras-chave: Transcritoma, qPCR, planta modelo, fatores de transcrição

**Characterization of the MICK-type genes of the MADS-box family in
Medicago truncatula during *in vitro* somatic embryogenesis**

ABSTRACT

MICK-type MADS-box genes constitute one of the main plant transcriptional factors gene families. These genes are directly involved in several plant developmental processes, especially in somatic embryogenesis, which is considered a limiting process for biotechnological procedures. The objective of this work was to analyze the role of the *MICK-type MADS-box* genes during *Medicago truncatula* somatic embryogenesis. The identification of 24 *MICK-type MADS-box* was done through *in silico* analysis in the *International Medicago Genome Annotation Group v. 3.5* (IMGAG) database. The identity confirmation of the genes found was done through sequence alignments with *MICK-type MADS-box* genes previously identified in other species. The gene expression analysis, which were performed by Real-time PCR, RNAseq and microarray, suggest that the genes *MtSVPa* (Medtr5g032520.1), *MtSVPb* (Medtr5g032150.1), *MtSVPc* (Medtr4g093970.1), *MtAGL24* (Medtr5g066180.1), *MtSOC.1* (Medtr7g075870.1), *MtAP3a* (Medtr3g113030.1), *MtAP3b* (Medtr5g021270.1), *MtAGL21.1* (Medtr5g031000.1) and *MtAGL21.2* (Medtr5g031000.2), are directly involved in the regulation of *Medicago truncatula* somatic embryogenesis. *MtAGL21.1*, *MtAGL21.2* and *MtSOC.1* presented differential expression standards between the embryogenic lines (M9-10a and 2HA) when compared to the less or non-embryogenic lines (M9 and Jemalong). The functional characterization of these genes may aid in elucidating the genetic components responsible for the *Medicago truncatula* somatic embryogenesis process.

Keywords: Transcriptome. qPCR. Model plant. Transcription factors

Introdução

A embriogênese somática é um processo descoberto em meados do século XX (Steward et al., 1958) e está relacionado à capacidade de células diferenciadas produzirem embriões em um processo semelhante à embriogênese zigótica (Zimmerman, 1993). Devido à importância da embriogênese somática, muitos estudos já foram realizados visando elucidar quais são os componentes genéticos que desencadeiam todo esse processo (Hecht et al., 2001; Boutilier et al., 2002; Thakare et al., 2008; Nolan et al., 2011).

Entre os componentes genéticos envolvidos no processo de embriogênese somática, estão os fatores de transcrição pertencentes à família de genes *MADS-box*, que atuam como reguladores-chave em muitos processos no desenvolvimento celular de diversos organismos, tais como fungos, animais e plantas (Becker e Theissen, 2003; Airoidi e Davies, 2012).

Os membros da família *MADS-box* são caracterizados por um domínio altamente conservado na região N-terminal, que codifica um domínio de ligação ao DNA, denominado *MADS*. O domínio *MADS* tem aproximadamente 60 aminoácidos e reconhece uma sequência específica [CC(A/T)₆GG], denominada *CARG-box*, na região regulatória de seus genes alvos (Hayes et al., 1988; Shore e Sharrocks, 1995; Riechmann et al., 1996; Khan et al., 2012).

A família *MADS-box* em plantas foi caracterizada por meio de estudos com *Arabidopsis thaliana*, a qual possui mais de 100 genes identificados para

essa família gênica, que são classificados em genes do tipo I e do tipo II (MIKC), sendo que apenas o segundo tipo foi extensivamente estudado, pois estes participam diretamente em muitos processos do desenvolvimento de plantas (Alvarez-Buylla et al., 2000; Becker e Theissen, 2003), inclusive da embriogênese somática (Thakare et al., 2008).

Em *Arabidopsis* já foram identificados 39 genes *MADS-box* do tipo II que são caracterizados por uma região conservada chamada de MIKC, que apresenta quatro domínios característicos [*MADS-box* (M); intermediário (I), queratina-*like* (K) e carboxi terminal (C)] que estão distribuídos desde a região amino terminal (N) até a região carboxi terminal (C) da proteína e são responsáveis pela conformação e especificidade funcional das proteínas *MADS-box* (Fan et al., 1997; Riechmann e Meyerowitz, 1997; Robles e Pelaz, 2005). Essas proteínas estão relacionadas com a formação da raiz, desenvolvimento da folha iniciação do florescimento, identidade do meristema floral, identidade do óvulo, desenvolvimento da semente, desenvolvimento do fruto, multiplicação celular e embriogênese (Theissen et al., 2000; Parenicova et al., 2003; Rijpkema et al., 2007; Smaczniak et al., 2012). De todos os genes já identificados com domínio MIKC, apenas o gene *AGAMOUS LIKE 15* está diretamente envolvido com a embriogênese somática em plantas (Thakare et al., 2008).

Com relação as plantas leguminosas, em *Medicago truncatula* foram encontrados apenas 22 genes *MADS-box* do tipo II, que estão distribuídos em 9

dos 13 grupos identificados em *Arabidopsis*, sendo que um dos grupos não encontrado foi o do gene *AGL15* (Hecht et al., 2005). Assim, em *Medicago truncatula* ainda não foi identificado genes *MADS-box* que estejam envolvidos diretamente na embriogênese somática. O objetivo com esse trabalho foi analisar qual é o papel dos genes *MADS-box* do tipo MIKC na embriogênese somática.

Material e Métodos

Análise in silico

As sequências dos genes da família *MADS-box* do tipo MIKC foram identificadas por meio do BLAST de sequências dos genes da superfamília B3 disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) contra o banco de dados de ESTs (Mt3.5v4_cds e Mt3.5v4_pep) de *Medicago truncatula*, disponibilizado no portal da Samuel Roberts Noble Foundation (Zhao Bioinformatics Laboratory, 2013).

As sequências de nucleotídeos de interesse foram comparadas com as sequências de proteínas de banco de dados públicos (NCBI) utilizando-se o algoritmo BLASTx. Para classificar a parte funcional da proteína, bem como sua matriz de leitura, foi utilizada a ferramenta ORF FINDER (Open Reading Frame Finder). O alinhamento da sequência da proteína de interesse com as proteínas

disponíveis no NCBI foi realizado por meio do algoritmo BLASTp (Altschul et al., 1997).

Análise filogenética

O alinhamento das sequências foi feito pelo programa ClustalW (Thompson et al., 1994) com os parâmetros padrões (default), utilizando-se as sequências de nucleotídeos traduzidas em aminoácidos. A árvore final foi feita utilizando-se o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007), com o modelo de comparação Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), método de distância p e supressão pair-wise. A validade da árvore quanto à distância filogenética dos clusters foi medida pelo teste probabilístico de bootstraps, originado de 10.000 replicatas.

Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Funcional de Plantas da West Virginia University (WV USA). Tanto para o trabalho de PCR em tempo real quanto o de transcriptoma (RNAseq), as sementes das linhagens M9-10a e M9 foram escarificadas e esterilizadas. A etapa de escarificação foi realizada em capela de exaustão, onde após imersão das sementes em ácido sulfúrico concentrado por 10 min, as sementes foram lavadas 3 vezes em água destilada fria (4°C). Em seguida as sementes foram levadas para fluxo laminar, e

esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% e detergente (10 µL/L de Tween 20) durante 10 min, seguido de 4 lavagens com água destilada autoclavada.

Após as etapas de escarificação e esterelização, as sementes foram colocadas em placas de Petri com papel de filtro autoclavado, e em seguida semeadas em frasco (1 semente/frasco) contendo 40 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose e 0,7% de agar. O pH do meio de cultura foi corrigido para 5,8 com KOH 0,1 M antes da adição de agar e autoclavagem. Os frascos foram mantidos durante 3 dias a 4 °C no escuro, em seguida foram transferidos para uma câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 24/22 °C (dia/noite) e intensidade luminosa de 100 µmol m⁻² s⁻¹ obtida a partir de lâmpadas brancas fluorescentes.

Aos 45 dias de cultivo, folhas completamente expandidas (explantes) foram coletadas (Figura 2) e submetidas ao cultivo *in vitro* em placas de Petri com 25 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de agar, 0,2 mg/L de zeatina, 0,1 mg/L de 2,4-D e cultivadas em regime de 16 h de fotoperíodo e irradiância de 100 µmol m⁻² s⁻¹ a 24°C até a coleta do material. As células de calos proliferando nas margens dos cortes das folhas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o isolamento do RNA.

Para o experimento de PCR em tempo real foram utilizadas três repetições biológicas para cada amostra, sendo 10 tempos de cultivo (0, 2, 6, 12, 24, 48, 96, 120, 240, 336 horas) e duas linhagens de *Medicago truncatula* [M9-10a, embriogênica e M9, que apresenta um baixo potencial embriogênico, e produzem essencialmente calos não-embriogênicos (Santos e Fevereiro, 2002)] em um delineamento inteiramente casualizado (Figura 1). Cada repetição biológica foi constituída por um conjunto de três placas de Petri com seis explantes (segmentos foliares) por placa.



Figura 1 Progressão da indução da embriogênese somática em *Medicago truncatula* linhagem M9-10a em comparação com a linhagem progenitora não embriogênica M9. Barra = 1 mm.

Quanto ao experimento de sequenciamento do transcriptoma (RNAseq), foram utilizadas três repetições biológicas para cada amostra, sendo 4 tempos de

cultivo (6, 24, 48 e 96 horas) e duas linhagens (M9-10a e M9) em um delineamento inteiramente casualizado (Figura 2). Cada repetição biológica foi constituída por um conjunto de cinco placas de Petri com seis explantes (segmentos foliares) por placa (Figura 2).

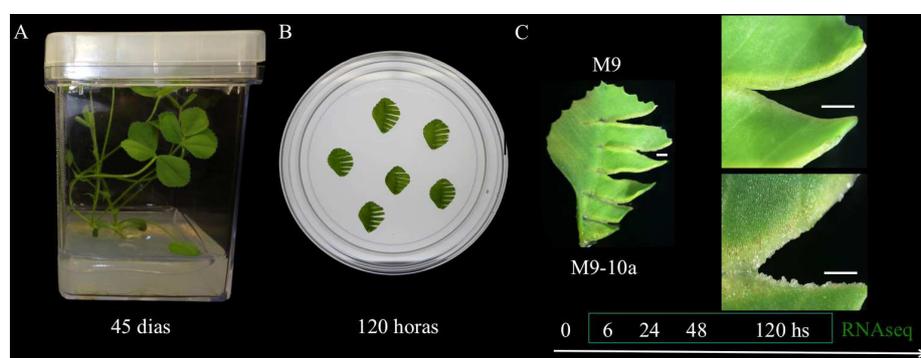


Figura 2 Esquema do experimento de sequenciamento de transcriptoma (RNAseq) de *Medicago truncatula*. (a) – Tempo de cultivo em meio MS. (b) – Número de explantes por placa e tempo de cultivo da embriogênese. (c) – Tempos de coleta dos explantes foliares. Barra = 1 mm.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Para extração do RNA, utilizou-se o kit mirVana (Ambion), seguindo as recomendações do manual para isolamento de RNA total. Em seguida, as amostras foram tratadas com o inibidor Turbo DNA-free Kit (Ambion), para eliminação de DNA residual. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose a 1%. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro

(Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000) . As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram usadas para a síntese de cDNA com o SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). Após a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Medicago Expression Atlas e RNAseq

Comparou-se a expressão dos genes *MADS-box* do tipo MIKC em diferentes tecidos (folha, broto, flor, sementes, raiz e nódulo) e uma linhagem altamente embriogênica (2HA) com uma linhagem com baixa capacidade embriogênica (Jemalong), submetidas a diferentes tempos de indução da embriogênese somática, usando o portal Medicago Expression Atlas (Benedito et al., 2008).

Foi analisado a expressão dos genes do tipo MIKC por meio do RNAseq para duas linhagens (M9-10a e M9) submetidas à diferentes tempos de indução (6, 24, 48 e 120 horas) da embriogênese somática, além de microarranjos (Imin et al., 2008) para outras linhagens [2HA (altamente embriogênica) e Jemalong (baixa capacidade embriogênica)] de *Medicago truncatula* também submetida à indução da embriogênese.

PCR em tempo real

A partir das sequências dos transcritos dos genes putativos *MtAGL21.1* (*AGAMOUS LIKE 21.1*) e *MtAGL21.2* (*AGAMOUS LIKE 21.2*) de *Medicago*

truncatula obtidas do estudo *in silico*, foram desenhados os primers para qPCR (Tabela 2) utilizando o programa Primer Express v2.0 da Applied Biosystems.

A análise de expressão gênica quantitativa por qPCR foi realizada com o modelo ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando SYBR Green e o cDNA obtido a partir de RNA extraído de segmentos foliares (explantos) dos dez tempos em estudo. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, e finalizando com 15 segundos a 95 °C. Os dados foram coletados e armazenados no programa 7500 Fast Software (Versão 2.1).

Para cada reação, foram utilizados 1,0 µL de cDNA (diluído 1:5), 0,2 µL de cada primer a 10 µM e 5,0 µL de Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen) para um volume final 10,0 µL/reação. As amostras foram processadas em triplicatas técnicas e os resultados foram normalizados usando CTs (Ciclo Threshold) obtidos pela expressão dos genes endógenos, *ACTINA* (*β-actin*), *UBIQUITINA* e *HELICASE*. O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (threshold). O método que foi usado é o do CT comparativo (Pfaffl, 2001).

Para usar o método CT comparativo foi realizado um experimento para validação dos primers, ou seja, comprovar que os primers apresentam uma alta eficiência (Tabela 1). Para isso foram realizadas curvas padrões para os genes

em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Este procedimento também permitiu a definição da melhor diluição do cDNA.

Tabela 1 *Primers* utilizados na qPCR (MtAGL21.1, MtAGL21.2).

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Eficiência (%)
MtAGL21.1 F	5' CAAGAAAACACACAACACTACACAAAAAGGT 3'	94
MtAGL21.1 R*	5' CGAACACTATATGGAAATTGAACAAACGC3'	
MtAGL21.2 F	5' TATAAGAAGGTGTATGGCACGACAG3'	93
MtAGL21.2 R*	5' CGAACACTATATGGAAATTGAACAAACGC 3'	
ACTINA F	5' TCAATGTGCCTGCCATGTATGT 3'	91
ACTINA R	5' ACTCACACCGTCACCAGAATCC 3'	
UBIQUITINA F	5' CTGACAGCCCACTGAATTGTGA 3'	93
UBIQUITINA R	5' TTTTGGCATTGCTGCAAGC 3'	
HELICASE F	5' GTACGAGGTCCGGTGCTCTTGAA 3'	99
HELICASE R	5' GCAACCGAAAATTGCACCATAC 3'	

*Foi utilizado o mesmo primer reverse para os genes MtAGL21.1 e MtAGL21.2

Resultados e Discussão

Análises filogenéticas

A busca por possíveis homólogos aos genes da família *MADS-box* do tipo MIKC, no banco de dados da espécie *Medicago truncatula* (Zhao Bioinformatics Laboratory, 2013) gerou um total de 136 sequências com similaridade significativa ($e\text{-value} < 10^{-4}$) para o domínio *MADS-box*, sendo que dessas, somente 22 são do tipo II (MIKC). Benlloch et al. (2009) isolaram e caracterizaram dois genes MIKC (*MtPI* e *MtNGL9*) que não foram encontradas nas buscas no banco de dados, mas foram utilizadas nas análises filogenéticas (Figura 3).

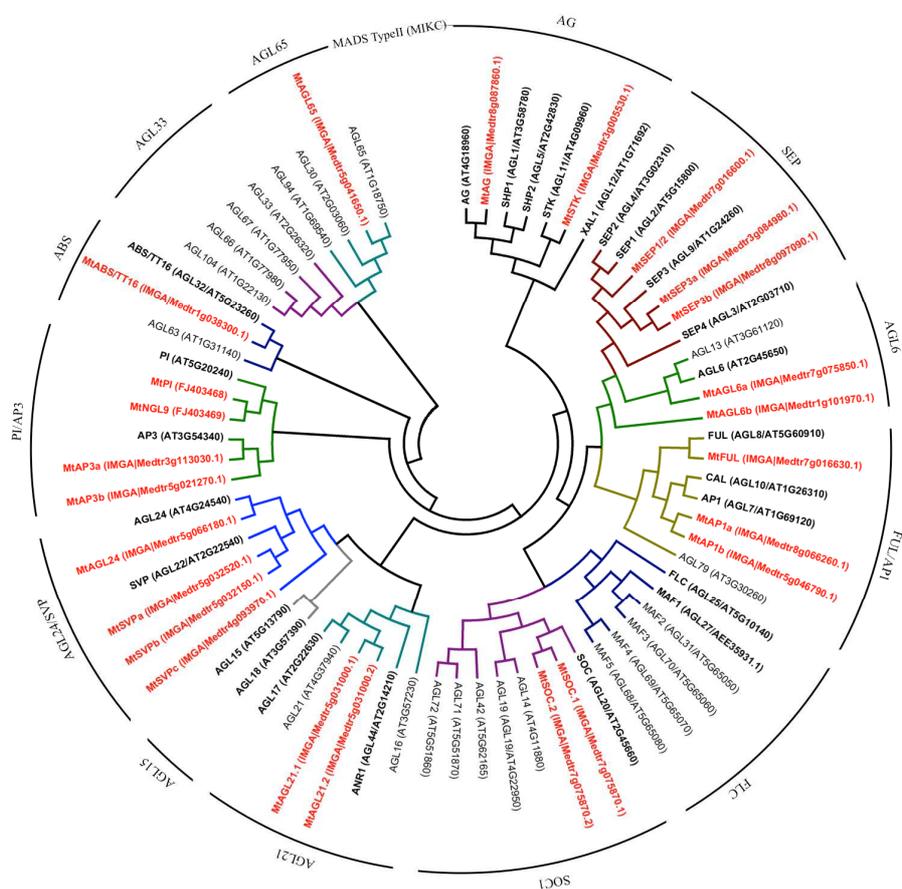


Figura 3 Árvore filogenética relacionando as prováveis sequências dos genes da família *MADS-box* do tipo MIKC de *Medicago truncatula*, em comparação com *Arabidopsis thaliana*. Palavras escritas de preto em negrito são referentes aos genes mais estudados em *Arabidopsis*, enquanto que em vermelho são os genes identificados em *Medicago truncatula*. Foi utilizado o modelo de comparação *Neighbor-joining*, pelo método de distância *p* e supressão *pair-wise*.

A análise das sequências de *Medicago truncatula* em comparação com *Arabidopsis thaliana* formou 13 clados, sendo que os 24 genes *MADS-box* do

tipo MIKC encontrados em *Medicago truncatula* estão distribuídos em 10 dos 13 clados formados (Figura 3). Não foram encontradas as sequências para os clados dos genes *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15)*, *AGAMOUS-LIKE 33 (AGL33)*, O *FLC* é o gene mais estudado, sendo considerado o maior repressor do florescimento (Boss et al., 2004; Yan et al., 2010), enquanto que o *AGL15* está envolvido com a embriogênese somática (Thakare et al., 2008), e o *AGL33* foi pouco estudado (Figura 3).

Os genes *MtAGL21.1* e *MtAGL21.2* identificados neste estudo são os que apresentaram maior identidade de sequência com o gene *AGL15* de *Arabidopsis*, com valores de identidade de 46% e 47%, respectivamente, porém, os dois genes foram classificados como *AGL21*, porque apresentam maiores valores de identidade para o *AtAGL21* (Tabela 2).

Tabela 2 Comparação das sequências dos possíveis homólogos aos genes da família *MADS-box* do tipo MIKC de *Medicago truncatula*, em comparação com *Arabidopsis thaliana* e outras espécies que tem sequências depositadas para estes genes na base de dados do NCBI.

Clados	Genes	blastp	E- valu e	Identidad e	Positivo s
AG	MtAG	AtAG 253aaAT4G18960	7e- 118	164/245 (67%)	202/245 (82%)
		PsAG 243aaAAX69069.1.	2e- 166	227/244 (93%)	239/244 (97%)
	MtSTK/AGL11	AtSTK 231aa	9e- 122	173/231 (75%)	199/231 (86%)
		AGL11/AT4G09960			
		GmAGL11 222aa NP_001236130.1	7E- 103	210/223 (94%)	214/223 (95%)

SEP	MtSEP1/2	AtSEP1 252aa	2e-	190/253	219/253
		AGL2/AT5G15800	128	(75%)	(86%)
		AtSEP2 251aa	4e-	187/251	215/251
		AGL4/AT3G02310	135	(75%)	(85%)
	MtSEP3a	MpSEP1 249aa	2e-	241/249	242/249
		AFU81295. 1	174	(97%)	(97%)
		AtSEP3251aa	2e-	187/247	209/247
		AGL9/AT1G24260	127	(76%)	(84%)
	MtSEP3b	LjSEP3 243aa	1e-	210/246	224/246
		AAX13298. 1	145	(85%)	(91%)
		AtSEP3251aa	1e-	192/281	211/281
		AGL9/AT1G24260	119	(68%)	(75%)
AGL6	MtAGL6a	LjSEP3 243aa	3e-	222/277	228/277
		AAX13298. 1	149	(80%)	(82%)
		AtAGL6253aa	9e-	166/276	200/276
		AT2G45650	113	(60%)	(72%)
MtAGL6b	GmAGL6 245aa	7e-	193/273	219/273	
	XP_003528894. 1	125	(71%)	(80%)	
	AtAGL6 253aa	7e-	103/272	145/272	
	AT2G45650	51	(38%)	(53%)	
FUL/API	MtFUL/AGL8	GmAGL6 245aa	4e-	149/281	178/281
		XP_003528894. 1	80	(53%)	(63%)
		AtFUL 243aa	5e-	131/254	171/254
		AGL8/AT5G60910	78	(52%)	(67%)
MtAP1a	GmAGL8 253aa	3e-	186/258	208/258	
	XP_003552610. 1	113	(72%)	(80%)	
	AtAP1 257aa	2e-	180/254	210/254	
	AGL7/AT1G69120	124	(71%)	(82%)	
	GmAP1 236aa	1e-	223/240	231/240	
	XP_003547792. 1	158	(93%)	(96%)	
	MtAP1b	AtAP1 257aa	4e-	146/228	177/228
		AGL7/AT1G69120	99	(64%)	(77%)
GmAP1 236aa		7e-	172/224	195/224	
XP_003547792. 1		117	(77%)	(87%)	
SOC	MtSOC.1	AtSOC 215aa	5e-	142/213	174/213
		AGL20/AT2G45660	93	(67%)	(81%)
		PtSOC1 216aa	3e-	191/218	198/218
	MtSOC.2	AAX47171. 2	123	(88%)	(90%)
		AtSOC 255aa	2e-	135/206	167/206
		AGL20/AT2G45660	87	(66%)	(81%)
AGL21	MtAGL21.1	PtSOC1 216aa	2e-	184/211	191/211
		AAX47171. 2	117	(87%)	(90%)
		AtAGL21 229aa	6e-	142/237	181/237
		AT4G37940	99	(60%)	(76%)
MtAGL21.1	GmAGL21 isoform1	8e-	185/237	203/237	
	XP_003534251. 1	124	(78%)	(85%)	

	MtAGL21.2	AtAGL21229aa AT4G37940	3e- 93	136/229 (59%)	173/229 (75%)
		GmAGL21 isoform2	221aa 1e- 120	177/223 (79%)	194/223 (86%)
		XP_003534252.1			
SVP/AGL2 4	MtSVPa	AtSVP 241aa AGL22/AT2G22540	5e- 116	171/241 (71%)	197/241 (81%)
		GmSVP 227aa NP_001240951.1	2e- 132	188/227 (83%)	208/227 (91%)
	MtSVPb	AtSVP 241aa AGL22/AT2G22540	2e- 112	162/241 (67%)	195/241 (80%)
		GmSVP 227aa NP_001240951.1	6e- 130	189/228 (83%)	208/228 (91%)
	MtSVPc	AtSVP 241aa AGL22/AT2G22540	5e- 61	109/240 (45%)	153/240 (63%)
		GmSVP 205aa XP_003531018.1	6e- 91	154/210 (73%)	176/210 (83%)
	MtAGL24	AtAGL24 221aa AT4G24540	4e- 57	90/153 (59%)	120/153 (78%)
		PtAGL24 225aa XP_002301093.1	1e- 56	95/155 (61%)	126/155 (81%)
ABS/TT16	MtABS/TT16	AtABS/TT16 248aa AGL32/AT5G23260	9e- 62	94/184 (51%)	133/184 (72%)
		VvTT16 236aa XP_002271905.2	3e- 59	113/243 (47%)	170/243 (69%)
PI/AP3	MtPI	AtPI 209aaAT5G20240	2e- 78	108/167 (65%)	139/167 (83%)
		LjPIb 181aaAAX13300.1	1e- 118	165/181 (91%)	178/181 (98%)
	MtNGL9	AtPI 209aaAT5G20240	1e- 72	101/168 (60%)	135/168 (80%)
		LjPIa AAX13299.1	208aa 1e- 94	139/174 (80%)	154/174 (88%)
	MtAP3a	AtAP3 AT3G54340	233aa 4e- 97	132/232 (57%)	175/232 (75%)
		LjAP3 AXX13301.1	229aa 3e- 156	209/229 (91%)	220/229 (96%)
	MtAP3b/TM6*	AtAP3 233aAT3G54340	5e- 69	107/220 (49%)	149/220 (67%)
		LjAP3 AXX13302.1	230aa 3e- 143	205/233 (88%)	217/233 (93%)
AGL65	MtAGL65	AtAGL65 390aa AT1G18750	1e- 81	141/290 (49%)	179/290 (61%)

GmAGL3 360aa	4e-	256/390	305/390
XP_003528580.1	175	(66%)	(78%)

*MtAP3b apresenta alta identidade com *TM6* de *Solanum lycopersicum*

Os genes MADS-box do tipo MIKC de *Medicago truncatula* apresentaram identidade de sequência variando de 38 a 76%, quando comparados com *Arabidopsis*, sendo o mínimo observado para o gene *MtAGL6b* e o máximo para o *MtSEP3a*. Além disso, mais de 80% dos genes tem identidade acima de 50% em relação à *Arabidopsis* e 70% com relação aos mesmos genes descritos em outras espécies.

Localização cromossômica de genes MIKC

Os genes MIKC estão distribuídos em 6 dos 8 cromossomos da espécie modelo *Medicago truncatula* (Figura 4). O cromossomo 5 apresentou o maior número de genes MIKC, com sete genes, seguido dos cromossomos 7 (quatro genes), 3 e 8 (três genes), 1 (dois genes) e 4 (um gene).

Esses resultados demonstram que muitos genes MIKC, membros da mesma subfamília estão localizados em cromossomos diferentes. Isto foi observado para as subfamílias dos genes *SEP*, *AGL6*, *API*, *SVP* e *AP3* que possuem membros em diferentes cromossomos (Figura 4). Estudos recentes demonstraram que houve uma duplicação do genoma de *Medicago truncatula* há cerca de 58 milhões de anos (Young et al., 2011).

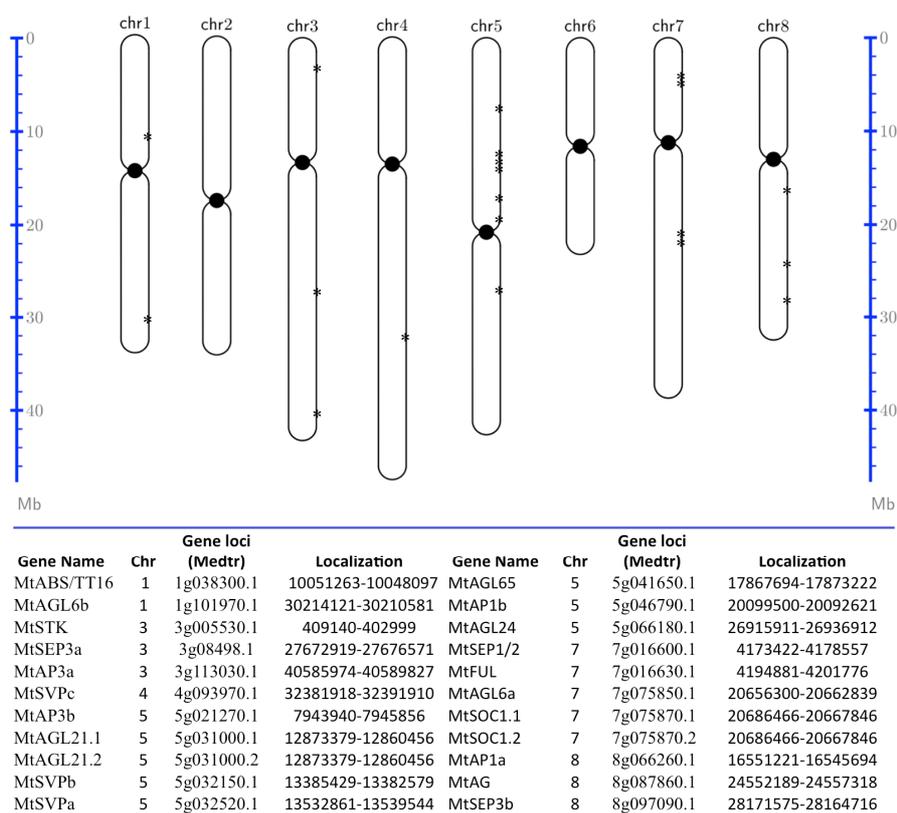


Figura 4 Localização cromossômica do genes MIKC em *Medicago truncatula*. Apenas os cromossomos que carregam genes MIKC(22) estão representados.

Roque et al. (2013) estudaram funcionalmente os genes *MtNMH7* e *MtTM6* que são *AP3-like* duplicados, os mesmo identificados no presente estudo como *MtAP3a* e *MtAP3b*. Porém foram classificados de acordo com a homologia entre *Medicago sativa* e *Solanum lycopersicum*. Os autores

observaram que a duplicação favoreceu para uma especificidade diferente para ambos os genes, o *MtNMH7* está mais relacionado com a identidade da pétala, enquanto o *MtTM6* com a identidade do estame, demonstrando o quanto a duplicação gênica é importante para a evolução de uma espécie.

Análise da expressão dos genes MIKC

De forma geral, os padrões de expressão dos genes MIKC duplicados foram diferentes tanto entre os tecidos estudados, quanto aos níveis de expressão para um mesmo tecido (Figura 5). Além disso, podemos observar aqui uma expressão diferencial para os genes *MtAP3a* e *MtAP3b*, com maiores níveis de expressão para ambos em flor, o que corrobora com estudos recentes (Roque et al., 2013).

Foi observado também altos níveis de expressão em flores para os genes *MtAG*, *MtSEP1/2*, *MtSEP3a*, *MtSEP3b*, *MtAGL6b*, *MtAP1a* (Figura 5a), pois juntamente com os genes *MtAP3a* e *MtAP3b* foram caracterizados em outras espécies como genes de identidade de órgãos florais, por meio do modelo ABCE de desenvolvimento floral, do qual faz parte os genes *AP1*, *AP2* (classe A), *AP3*, *PI* (classe B), *AG* (classe C), *SEP1*, *SEP2*, *SEP3* e *SEP4* (classe E) (Krizek e Fletcher, 2005; Causier et al., 2010).

Vale ressaltar que *MtPI* e *MtNGL9* identificados recentemente (Benlloch et al., 2009), também fazem parte do modelo ABCE em *Medicago truncatula* e

que o gene *MtAGL6b* identificado no presente trabalho, embora não faça parte desse modelo em outras espécies, é um dos genes duplicados, e está próximo ao clado dos genes da classe E (*MtSEP1/2*, *MtSEP3a*, *MtSEP3b*) do modelo ABCE.

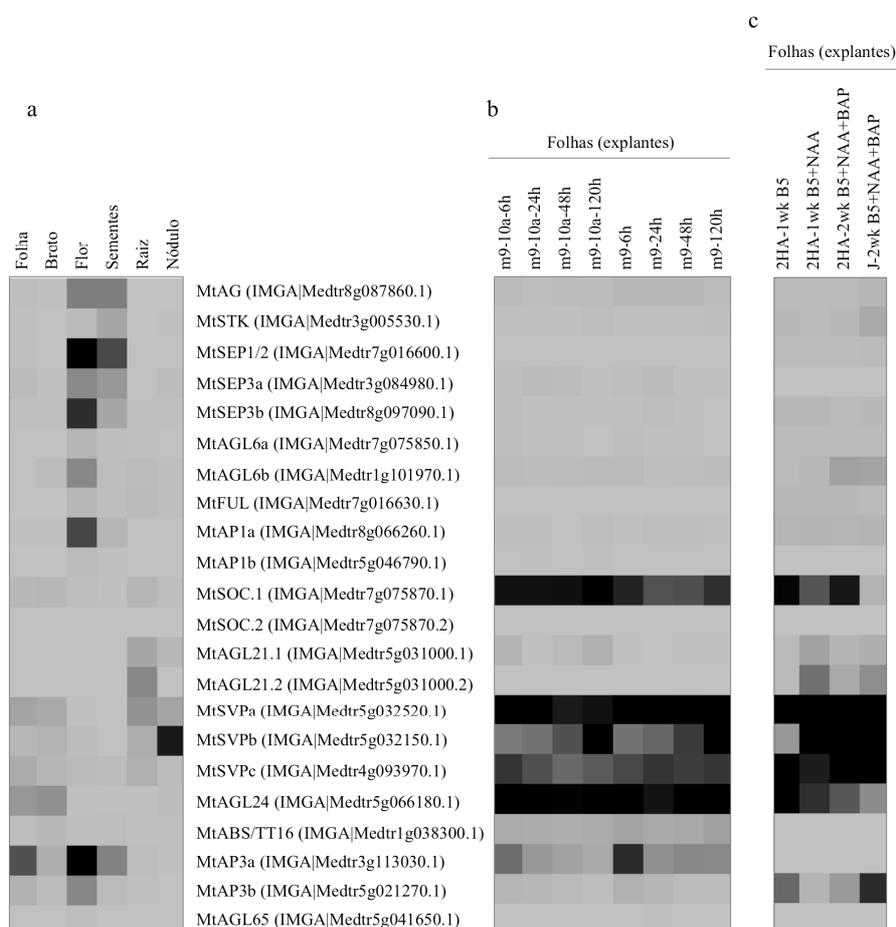


Figura 5 Northern Eletrônico representando os níveis de expressão dos genes MIKC nas diferentes bibliotecas por meio de uma escala cinza, onde quanto mais escura for a cor, maior a expressão. (a) – RNaseq para diferentes tecidos. (b) – RNaseq para duas linhagens (M9 e M9-10a)

em diferentes tempos de indução da embriogênese. (c) – Microarranjos para duas linhagens (2HA e Jemalong) durante a indução da embriogênese.

Com relação à embriogênese somática os genes *MtSVPa*, *MtSVPb*, *MtSVPc*, *MtAGL24*, e *MtSOC.1* apresentaram altos níveis de expressão tanto para as linhagens M9 e M9-10a (Figura 5b), quanto para as linhagens 2HA e Jemalong (Figura 5c). Em *Arabidopsis*, os genes *SOCI* e *AGL24* são promotores do florescimento (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008), enquanto que o *SVP* regula o florescimento negativamente (Hartmann et al., 2000) por meio da repressão da transcrição dos genes *SOCI* e *FT* (Li et al., 2008).

Outros genes também apresentaram altos níveis de expressão durante indução da embriogênese somática, porém não mais para as quatro linhagens estudadas, foi o caso do gene *MtAP3a* que apresentou altos níveis de expressão para as linhagens M9 e M9-10a (Figura 5b) e dos genes *MtAP3b*, *MtAGL21.1* e *MtAGL21.2* que apresentaram altos níveis de expressão para as linhagens 2HA e Jemalong (Figura 5c). Burgeff et al. (2002) observaram que o gene *AGL21* é expresso nos primórdios laterais das raízes e em meristema radicular primário de *Arabidopsis thaliana*. Os genes *MtAP3a* e *MtAP3b* foram estudados em *Medicago truncatula* e estão envolvidos com a identidade de órgãos florais (Roque et al., 2013).

Esses resultados sugerem que os genes MADS-box do tipo MIKC podem estar envolvidos com a embriogênese somática em *Medicago truncatula*,

com destaque para os genes *MtAGL21.1*, *MtAGL21.2* e *MtSOC.1* que apresentaram padrão de expressão diferencial para linhagens embriogênicas (*M9-10a* e *2HA*) quando comparadas com as linhagens não-embriogênicas ou pouco embriogênicas (*M9* e *Jemalong*). O gene *AGL21* é expresso em meristema radicular primário (Burgeff et al., 2002), enquanto que o *SOC1* é expresso em meristema apical (Samach et al., 2000).

Expressão Gênica por qPCR

Quando analisamos a expressão relativa dos genes *MtAGL21.1* e *MtAGL21.2*, foi possível observar um padrão de expressão semelhante, com aumento nos níveis de expressão de pelo menos duas vezes para a linhagem M9 com 336 horas de cultivo (Figura 6).

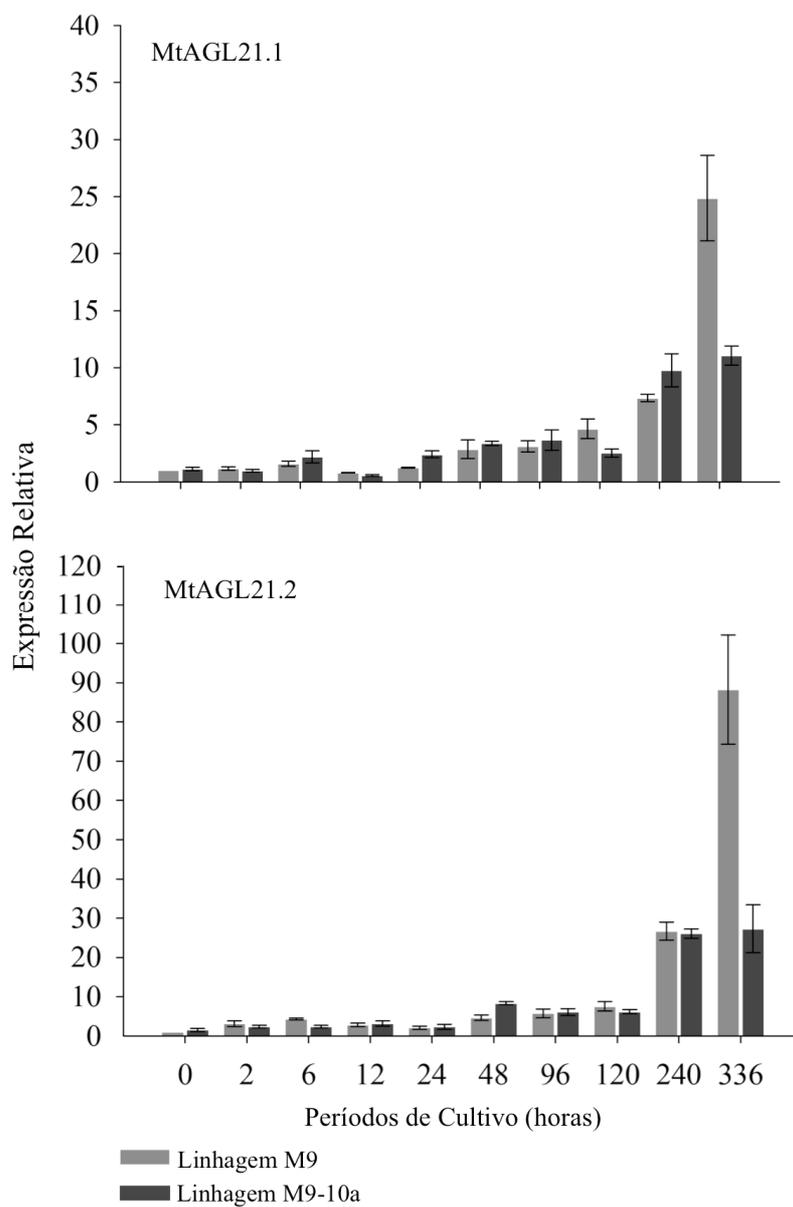


Figura 6 Perfil da expressão por qPCR dos genes *MtAGL21.1* e *MtAGL21.2* durante o período de indução da embriogênese somática de 336 horas de cultivo, para explantes foliares da linhagem altamente

embriogênica M9-10a e uma com baixa capacidade embriogênica M9 de *Medicago truncatula*. O eixo x representa o tempo de cultivo dos explantes foliares mantidos em meio de sais MS com 3% de sacarose, 0,7% de agar, 0,2 mg/L de zeatina, 0,1 mg/L de 2,4-D e o eixo y representa a expressão relativa. As barras de erro representam o desvio de três replicatas biológicas. Cada dado foi normalizado pela média dos valores de expressão dos genes de referência *ACTINA* (β -*actin*), *UBIQUITINA* e *HELICASE*. A amostra normalizadora para os genes *MtFUSCA* e *MtABI3* foi a dos explantes foliares no tempo 0 de cultivo para a linhagem M9.

Esse aumento nos níveis de expressão pode está associado ao fato de ambos os genes estarem envolvidos no processo do desenvolvimento da raiz (Figura 5), uma vez que a linhagem M9, embora não apresente formação de embriões, forma raízes (Figura 7).

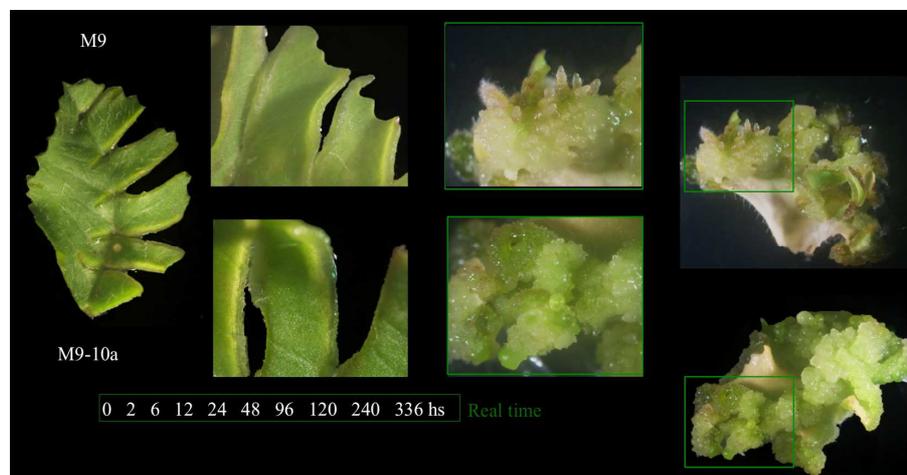


Figura 7 Comparação da indução da embriogênese somática entre a linhagem embriogênica “M9-10a” e a não embriogênica “M9” de *Medicago truncatula*.

Conclusão

Este estudo possibilitou a identificação dos genes *MtSVPa*, *MtSVPb*, *MtSVPc*, *MtAGL24*, *MtAP3a*, *MtAP3b*, *MtAGL21.1*, *MtAGL21.2* e *MtSOC.1* da família MADS-box do tipo MIKC que parecem estar envolvidos na regulação da embriogênese somática em *Medicago truncatula*. A caracterização funcional desses pode ajudar a desvendar quais são os componentes genéticos responsáveis pela embriogênese somática em *Medicago truncatula*.

REFERÊNCIAS

- Airoldi CA, Davies B (2012) Gene duplication and the evolution of plant MADS-box transcription factors. *J Genet Genomics* **39**: 157-165
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang J, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* **25**: 3389-3402
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* **24**: 457-466
- Becker A, Theissen G (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* **29**: 464-489.
- Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T, Moreau S, Niebel A, Frickey T, Weiller G, He J, Dai X, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **55**: 504-513.
- Benlloch R, Roque E, Ferrándiz C, Cosson V, Caballero T, Penmetsa RV, Beltrán JP, Cañas LA, Ratet P, Madueño F (2009) Analysis of B function in legumes: PISTILLATA proteins do not require the PI motif for floral organ development in *Medicago truncatula*. *Plant J* **6**:102-111
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* **16**: S18-S31
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, Van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, Van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14**: 1737-1749
- Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-López R, Yanofsky MF, Alvarez-Buylla ER (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **214**: 365-372
- Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B (2010) Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 73-79

- Fan HY, Hu Y, Tudor M, Ma H (1997) Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J* **12**: 999-1010
- Hartmann U, Hohmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P (2000) Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J* **21**: 351-360
- Hayes TE, Sengupta P, Cochran BH (1998) The human c-fos serum response factor and the yeast factors GRM/PRTF have related DNA-binding specificities. *Genes Dev* **2**: 1713-1722
- Hecht V, Foucher F, Ferrandiz C, Macknight R (2005) Conservation of arabidopsis flowering genes in model legumes. *Plant Physiol* **137**: 1420-1434
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt, ED, Boutilier K, Grossniklaus U, De Vries SC (2001) The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* **127**: 803-816
- Imin N, Goffard N, Nizamidin M, Rolfe BG (2008) Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures. *BMC Plant Biol* **8**: 110
- Khan MR, Hu J, Ali GM (2012) Reciprocal loss of CArG-Boxes and Auxin response elements drives expression divergence of MPF2-Like MADS-Box genes controlling calyx inflation. *PLoS ONE* **7**: e42781
- Krizek BA, Fletcher JC (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat Rev Genet* **6**: 688-698
- Lee J, Oh M, Park H, Lee I (2008) SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant J* **55**: 832-843
- Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H (2008) A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev Cell* **15**: 110-120
- Liu C, Chen H, Er HL, Soo HM, Kumar PP, Han JH, Liou YC, Yu H (2008) Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development* **135**: 1481-1491

- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol* **15**: 473-479
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2011) Characterisation of the legume SERK-NIK gene superfamily including splice variants: implications for development and defence. *BMC Plant Biol* **11**: 44-60
- Parenicova L, Folter S, Kieffer M (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**: 1538-1551
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* **29**: 45-49
- Riechmann J, Krizek B, Meyerowitz E (1996) Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4793-4798
- Riechmann JL, Meyerowitz EM (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem* **378**: 1079-1101
- Rijpkema AS, Gerats T, Vandenbussche M. (2007) Evolutionary complexity of MADS complexes. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 32-38
- Robles P, Pelaz S (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* **49**: 633-643
- Roque E, Serwatowska J, Cruz Rochina M, Wen J, Mysore KS, Yenush L, Beltrán JP, Cañas LA (2013) Functional specialization of duplicated AP3-like genes in *Medicago truncatula*. *Plant J* **73**: 663-675
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G. (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* **288**: 1613-1616
- Santos D, Feveireiro P (2002) Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **70**: 155-161

Shore P, Sharrocks AD (1995) The MADS-box family on transcriptional factors. *Eur J Biochem* **229**: 1-13

Smaczniak C, Richard GH, Immink GC, Angenent KK (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS- domain factors: insights from recent studies. *Development* **139**: 3081-3098

Steward FC, Mapes MO, Smith J (1958) Growth and organized development of cultured cells: I. growth and division of freely suspended cells. *Am J Bot* **45**: 693-703

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis: software: version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599

Thakare D, Tang W, Hill K, Perry SE (2008) The MADS-Domain transcriptional regulator *AGAMOUS-LIKE15* promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and *Soybean*. *Plant Physiol* **146**: 1663-1672

Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Munster T, Winter KU (2000) A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol* **42**: 115-149

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **22**: 4673-4680

Yan Z, Liang D, Liu H, Zheng G (2010) Flc: a key regulator of flowering time in *Arabidopsis* Russian Journal of Plant Physiology. *Russ J Plant Physiol* **57**: 166-174

Young ND, Debelle F, Oldroyd GED, Geurts R (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **480**: 520-524

Zhao Bioinformatics Laboratory (2013) *BLAST against NT*.
<http://bioinfo3.noble.org/doblast/>

Zimmerman LJ (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* **5**: 1411-1423

“VERSÃO PREMILINAR”