

BC/13893
IB/80212

T/UNICAMP

Si38_c



MÁRCIO JOSÉ DA SILVA

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo candidato Márcio José da Silva e aprovada pela comissão julgadora em 25/4/91

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES ADH-0 EM MILHO (*Zea mays* L.)
OBTIDOS ATRAVÉS DE VARIAÇÃO SOMACLONAL**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Genética Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. PAULO ARRUDA

Campinas, SP. 1991.

CLASSIF.	T
AUTOR.	W.S.P.
V.	BA
TOMBO Nº	13893
	1.9.1956

CM-00011289-3

À meus pais,

Pedro e Lourdes

À Célia, Melissa e Luciano

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Paulo Arruda, pela orientação, incentivo e desempenho científico demonstrado ao longo destes anos, pela amizade e convivência que têm conduzido à minha formação profissional e científica bem como todos os caminhos para sua realização.

Ao professor Dr. Adilson Leite, pela condução das análises moleculares, pela discussão, revisão e valiosas sugestões que resultaram no presente trabalho, pela amizade e incessante espírito de colaboração.

À Sílvia Regina Turcinelli, pela colaboração na leitura do texto e pelas valiosas sugestões, pela eficiência e exemplo de conduta no dia a dia de trabalho, pela amizade.

Ao amigo José Andrés Yunes, pela interpretação e discussão durante as análises estatísticas apresentadas no presente trabalho, pelo convívio e otimismo.

À Dra. Laura M.M. Ottoboni e Maria Luiza N. Targon, pela convivência e profissionalismo que têm demonstrado.

Ao Ronilson Moreno, pela amizade, incentivo e colaboração que muito me ajudaram.

Ao amigo Ricardo Antunes de Azevedo, pelo estímulo e exemplo de dedicação à pesquisa que tem demonstrado durante o seu treinamento no exterior.

Ao Marcelo Menossi Teixeira, pela amizade, pelo desempenho e disposição que muito me ajudaram nesta fase final.

UNICAMP e aos dirigentes imediatos, pela oportunidade e confiança em mim depositada no cumprimento das minhas obrigações durante o desenvolvimento desta tese.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Evolução, pela disposição e apoio que possibilitaram a execução do presente trabalho.

Aos alunos e colegas do Laboratório de Genética Vegetal, pela amizade, apoio e confiança.

À minha esposa Célia, pelo apoio e compreensão, pela dedicação e por me fazer ponderar lar/trabalho, algumas vezes que hesitei.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 - Variação somaclonal.....	1
1.2 - Origem da variação somaclonal.....	2
1.2.1 - Análise das alterações genéticas de variantes somaclonais	2
1.2.2 - Elementos de transposição como geradores de variabilidade genética em cultura de tecidos	4
1.3 - Somaclones ADH-deficientes.....	7
1.4 - Sistema ADH em milho	9
2 - OBJETIVOS.....	12
3 - MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 - Material biológico.....	14
3.1.1 - Linhagens de milho.....	14
3.1.2 - Calos embriogênicos friáveis	16
3.1.3 - Plasmídeo pH2.3.....	17
3.2 - Preparação de material e normas de esterilidade.....	17
3.2.1 - Vidraria e material descartável	17

3.2.2 - Reagentes.....	19
3.2.3 - Enzimas e "kits".....	23
3.2.3.1 - Enzimas de restrição e modificação empregadas	23
3.2.3.2 - "Random-primer"	23
3.2.4 - Membranas.....	23
3.2.4.1 - Membrana "Hybond-mAP"	23
3.2.4.2 - Membrana Hybond-N	24
3.2.4.3 - Membrana DEAE-celulose.....	24
3.2.4.4 - Membrana de diálise	24
3.2.5 - Soluções estoques de uso geral.....	24
3.2.6 - Meios de cultura	28
3.2.6.1 - Bactérias.....	28
3.2.6.2 - Cultura de tecidos	28
3.3 - Eletroforese.....	31
3.3.1 - Preparo das amostras a partir de escutelos induzidos	31
3.3.2 - Preparo das amostras de calos e/ou microcalos.....	32
3.3.3 - Eletroforese em gel de amido	32
3.4 - Transferência do gene Adh1-2F11 para a linhagem CAT-100-1.....	35
3.5 - Obtenção de calos embriogênicos friáveis	35
3.6 - Obtenção de microcalos.....	37
3.7 - Inibição do crescimento de microcalos pelo álcool alílico, coeficiente de sobrevivência e I ₅₀	38
3.8 - Processo seletivo de microcalos de milho	39
3.9 - Determinação da concentração de proteínas	40
3.10 - Determinação da atividade da ADH.....	40
3.10.1 - "Dot blot" um método rápido na determinação qualitativa da atividade da ADH.....	40

3.10.2 - Determinação quantitativa da ADH	41
3.11 - Determinação de V_{max} e K_m	42
3.12 - Determinação da presença de inibidor da ADH.....	43
3.13 - Isolamento de DNA e RNA.....	44
3.13.1 - Purificação de DNA genômico	44
3.13.2 - Purificação de RNA	48
3.13.2.1 - Purificação de RNA total.....	48
3.13.2.2 - Isolamento de mRNA poli(A) ⁺	50
3.13.3 - Purificação de DNA plasmidial.....	52
3.14 - Digestão de DNA com enzima de restrição	58
3.15 - Eletroforese de DNA	61
3.16 - Eletroforese de mRNA poli(A) ⁺ . Gel de agarose-formaldeído.....	63
3.17 - Purificação de inserto a partir de gel de agarose.....	67
3.18 - Transferência de DNA e mRNA para filtros de nylon.....	70
3.18.1 - Transferência de fragmentos de restrição de DNA.....	71
3.18.2 - Transferência de mRNAs poli(A) ⁺ para membrana "Hybond-mAP"	75
3.19 - Marcação Radioativa do DNA. "Random-primer"	77
3.19.1 - "Random-primer".....	77
3.19.2 - Quantificação da incorporação de radioatividade	80
3.20 - Hibridização de sondas de DNA sobre filtros de DNA	81
3.21 - Hibridização de sondas de DNA sobre filtro de RNA	86
3.22 - Densitometria.....	86

4 - RESULTADOS.....	87
4.1 - Determinação do padrão eletroforético da enzima ADH.....	87
4.2 - Seleção de linhagens de calos deficientes em ADH	90
4.2.1 - Efeito do álcool alílico sobre o crescimento de microcalos. Determinação da taxa de sobrevivência e I ₅₀	90
4.2.2 - Análise dos microcalos tolerantes as altas concentrações de álcool alílico.....	92
4.3 - Variação somaclonal ocorrida no gene da Adh1	99
4.3.1 - Análises bioquímicas.....	99
4.3.1.1 - Atividade específica da ADH.....	99
4.3.1.2 - Inibição enzimática	100
4.3.1.3 - Cinética enzimática.....	103
4.3.2 - Análise molecular.....	107
4.3.2.1 - Alteração da transcrição ("Northern Blotting")	107
4.3.2.2 - Análise molecular do gene da Adh1 ("Southern Blotting")	114
5 - DISCUSSÃO.....	120
6 - CONCLUSÕES.....	124
7 - RESUMO/ABSTRACT.....	126
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 - Variação somaclonal

Para muitas espécies de plantas têm-se documentado a ocorrência de variações fenotípicas espontâneas originárias da cultura de tecidos, incluindo protoplastos, cultura de calos e explantes. A assim chamada variação somaclonal foi observada pela primeira vez em cana de açúcar (*Saccharum spp*) (Heinz & Mee, 1971; Armstrong & Green, 1985) e posteriormente em grande número de espécies, tais como arroz, milho, centeio, alfafa, tomate, etc. (Larkin & Scrowcroft, 1981; Gracen & Earle, 1985). A ocorrência da variação somaclonal tem aspectos positivos e negativos. Na propagação *in vitro* ela é indesejável, uma vez que tipos distintos do explante original perdem completamente o seu valor. Alterações espontâneas também podem ser um problema em termos de transformação de células; uma alta frequência de respostas não correlacionadas com a manipulação experimental pode levar a interpretações ambíguas ou errôneas dos resultados obtidos e conseqüente derivação de plantas com características distintas daquelas desejadas através da incorporação dos genes específicos.

Alterações inesperadas após a cultura de tecidos conduzem a questões importantes sobre a natureza e plasticidade do genoma vegetal. A natureza da

variação somaclonal, extensão e possível origem têm sido abordadas do ponto de vista das células cultivadas e plantas regeneradas, variação citoplasmática e bases biológica e epigenética.

A variação somaclonal observada em plantas regeneradas pode estar associada com alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais e também com caracteres sob controle genético qualitativo e quantitativo que, muitas vezes, são importantes para o melhoramento genético das plantas cultivadas. Essas variações podem ter um potencial para gerar novas formas de variação somaclonal ou serem estáveis e transmitidas para as progênes das gerações subsequentes.

1.2 - Origem da variação somaclonal

Muitas hipóteses têm sido levantadas para explicar a variação somaclonal. Acredita-se hoje que, em parte, esse fenômeno resulta da variabilidade genética pré-existente nas células somáticas utilizadas como fonte de explantes para iniciar as culturas. Podem ter influência o genótipo da planta e o grau de organização meristemática durante a cultura. Fatores físicos e químicos intrínsecos à cultura de tecidos *in vitro*, tais como temperatura, luminosidade, intervalos das subculturas, e composição do meio de cultura, principalmente no que se refere à concentração de hormônios e reguladores de crescimento também exercem influência. (Larkin et al., 1985 e D'Amato, 1986).

1.2.1 - Análise das alterações genéticas de variantes somaclonais.

Técnicas que incluem microscopia óptica, análise molecular dos ácidos nucléicos e análise genética clássica através de retrocruzamentos, teste de alelismo, de variantes somaclonais e outros têm evidenciado muitos dos possíveis mecanismos que resultam em alterações do genoma. D'Amato (1978)

e Larkin et al. (1985) observaram que a ocorrência de alterações cromossômicas numéricas (aneuploidia) é alta em cultura de tecidos vegetais em várias espécies. A análise citogenética de somaclones mostrou a ocorrência de inversões, translocações e deleções originadas de quebras cromossômicas (McCoy et al., 1982; Benzion et al., 1986).

Ashmore & Gould (1981) observaram perda de cromatina, recombinação entre cromossomos não homólogos e cromossomos com dois ou mais centrômeros, que aparentemente resultaram de fusões cromossômicas.

Lee & Phillips (1988) resumiram dados citológicos coletados de plantas regeneradas de várias espécies e concluíram que o tipo predominante de alteração é a modificação na estrutura cromossômica.

Eventos que levam à quebra cromossômica e subsequente recombinação ou reunião de fragmentos são de fundamental importância. A maioria dos eventos resulta em perda de cromatina que varia desde a eliminação completa de um dos braços do cromossomo (cromossomo telocêntrico ou acrocêntrico), até deleções de 10 a 20% do tamanho do braço do cromossomo. Recombinação de grandes fragmentos entre cromossomos não homólogos produzem translocações recíprocas. Ganho de cromatina, aumento do número de cromossomos e duplicação de segmentos não são eventos muito frequentes. Talvez porque isso ocorra raramente ou porque as células envolvidas não proliferam durante a cultura e, conseqüentemente, não estão presentes nas plantas regeneradas. Enfim, existem eventos que conduzem a uma troca de cromossomos ou fragmentos de cromátides (trocas entre cromátides irmãs ou formas de recombinação somática) e eventos que geram cromossomos acêntricos causados por fragmentos de cromatinas acopladas ou pela perda dos fragmentos.

A Análise da localização dos pontos de quebra dos cromossomos sugere que os eventos de rearranjo em células de plantas regeneradas podem

envolver cromossomos específicos e regiões também específicas dos cromossomos, particularmente regiões que contêm heterocromatina. Lee & Phillips (1987) demonstraram que 51% das translocações ocorridas em cultura de tecidos de *Zea mays* L. estão envolvidas com a região organizadora do nucléolo. Estudos da localização dos pontos de quebra dos cromossomos em cultura de tecidos também evidenciam uma distribuição não aleatória, quando comparados com pontos de quebra espontâneas. Geralmente os pontos de quebra ocorrem entre a heterocromatina e o centrômero. Ainda não está bem definido o papel da estrutura e função da heterocromatina e regiões específicas responsáveis pelo rearranjo dos cromossomos. Está estabelecido que a replicação tardia da heterocromatina, durante o ciclo mitótico das células, muitas vezes causa alterações na estrutura cromossômica observadas durante a cultura *in vitro*. A replicação tardia produz quebras introduzindo nos ciclos celulares o fenômeno de quebra-fusão-ponte-quebra. Este fenômeno é responsável por extensas alterações no genoma da célula incluindo ativação de elementos de transposição (Lee & Phillipis, 1988).

1.2.2 - Elementos de transposição como geradores de variabilidade genética em cultura de tecidos

Apesar de muitas características genéticas selecionadas direta ou indiretamente apresentarem-se estáveis por muitas gerações através da variação somaclonal, (Ahlowalia & Sherington, 1985; Groose & Phillips, 1986), tem-se observado que algumas dessas características são instáveis nas plantas regeneradas e nas suas progênes. Essa instabilidade pode ser causada pela ativação de elementos de transposição (transposons), que ao excisarem ou inserirem em alguma parte do genoma podem liberar ou reprimir a expressão de gene. Muitas investigações têm sustentado a hipótese de que elementos de transposição antes inativos são ativados e detectados entre as plantas regeneradas e em suas progênes (Larkin & Scrowcroft, 1981). A ativação desses elementos pode ser originada devido à quebra cromossômica e rear-

ranjo durante a cultura de tecidos. Esses elementos crípticos residem em regiões de cromatina inativa e podem sofrer mudanças no seu padrão de metilação, permitindo que as enzimas de transposição reconheçam os sítios específicos de ligação e conseqüente excisão (Lee & Phillips, 1988). Uma vez ativados, os elementos de transposição geram variabilidade genética através da excisão ou inserção em genes ativos.

Em milho, vários sistemas de transposição têm sido descritos desde a descoberta do sistema Ac/Ds por McClintock em 1950. De acordo com Ahloowalia & Sherington (1985), condições de estresse estabelecidas em cultura de tecidos poderiam induzir ou ativar os elementos de transposição. Evidências desse fato têm sido observadas através da análise do genoma do milho com sondas clonadas de elementos Ds (Evola et al., 1984; Evola et al., 1985 citado por Peschke et al., 1987) e Mu (Planckaert & Walbot, 1989). No caso do elemento Ds, a análise revelou a existência em vários linhagens de 30 a 40 sinais positivos de aproximadamente 300 pares de bases sugerindo a existência de um grande número desses elementos no genoma do milho, essas cópias de transposons entretanto, encontram-se inativas, devido principalmente à metilação dos terminais invertidos repetidos (Merckelbach et al., 1986). Por outro lado, é possível que haja sequências homologas entre o ponto de inserção no genoma e as sequências terminais do elemento Ds, implicando assim em sítios potenciais no genoma, nos quais o elemento Ds poderia se inserir (Peacock, et al., 1983). Tal fato também tem sido observado em outras famílias de elementos de transposição como Mu, Spm, Dt, etc.

Como discutido por McClintock (1984), o genoma pode reagir de maneira programada às condições estressantes do meio ambiente, tais como calor, anaerobiose, oscilações de osmolaridade, etc. Para cada tipo de choque inicia-se uma sequência programada de eventos no interior celular, que servem para proteger a célula dos efeitos do choque. O genoma de uma célula vegetal também está capacitado para interagir com outros organismos, sejam eles insetos, bactérias, fungos ou vírus. Os tumores das raízes de leguminosas, que estão associados com a fixação de nitrogênio pelas bactérias do gênero

Rhizobium, ilustram claramente como as plantas têm o seu genoma programado para resposta a um estímulo de um organismo estranho. Entretanto, há respostas do genoma para alterações inéditas do ambiente, que não estão programadas pelas células, como por exemplo exposição ao raio-X ou a drogas mutagênicas. Assim, embora o genoma não esteja preparado para esses choques, quando eles ocorrem há uma resposta de maneira até então desconhecida. Esta resposta pode resultar na reestruturação do genoma (McClintock, 1984).

Mottinger et al. (1984) demonstraram que células de plantas de milho quando infectadas com o vírus do mosaico de cevada, um vírus de RNA, respondem através da ativação de elementos de transposição que estavam inativos em seu genoma. Estes elementos podem entrar em um locus gênico e modificar sua expressão.

Situação semelhante ocorre em cultura de tecidos, pois várias modificações são induzidas no genoma quando as células são transferidas das condições naturais nos tecidos da planta para o meio de cultura artificial. Essa mudança pode constituir uma condição estressante, levando à ativação dos elementos de transposição. Pela modificação gênica, esses elementos podem reestruturar o genoma em vários níveis através de alterações envolvendo poucos nucleotídeos ou amplas modificações de grandes segmentos de cromossomos, como duplicações, deficiências, inversões e outras reorganizações mais complexas (McClintock, 1984).

A ativação de elementos de transposição, durante a cultura de tecidos de milho, tem sido sugerida para as várias famílias de transposons conhecidas. Gorman & Peterson (1978) mostraram atividade do elemento "Enhancer" (En) em culturas de endosperma, e Benzion et al. (1986) detectaram quebra cromossômica, devido a ativação do sistema Ac/Ds em plantas regeneradas de células embriogênicas. Masterson et al. (1988) não obtiveram sucesso na tentativa de demonstrar a atividade de um elemento homólogo ao Mu1 em linhagens de cultura de tecidos derivadas da linhagem A188 (Minnesota).

Entretanto, Planckaert & Walbot (1989) demonstraram excisão e inserção do elemento Mu1 em cultura de células e plantas regeneradas de linhagens com diferentes frequências de transposição desse elemento. Peschke et al. (1987) detectaram a ativação do elemento Ac em plantas regeneradas da cultura de tecidos de milho, a partir de explantes que anteriormente não apresentavam nenhuma atividade desse elemento. Através de cruzamentos com estoques testadores desse elemento, entre 1.200 progênies testadas, 10 somaclones mostraram transposição do elemento Ac.

1.3 - Somaclones ADH-deficientes.

É possível obter somaclones de calos ou linhagens de células deficientes na atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH-0) através de seleção em meio de cultura. Em culturas de tecidos em meio contendo 2,4D (ácido 2,4 diclorofenoxi-acético), a indução da atividade da ADH é devido a "síntese de novo" durante a formação e desenvolvimento do calo (Jacobs et al., 1985). Mutantes ADH-0 e/ou ADH-deficientes podem ser selecionados pelo tratamento com álcool alílico.

O álcool alílico, quando adicionado ao meio de cultura, atinge o citoplasma das células, onde pela atividade da ADH, é oxidado (Figura - 1), transformando-se em acroleína, ocasionando a morte das células. As células que não possuem atividade da ADH não fazem a conversão do álcool alílico em acroleína, portanto, não são afetadas (Schwartz & Osterman, 1976).

A seleção de mutantes ADH-0 foi previamente descrita por Megnet (1967), que inoculou *Saccharomyces cerevisiae* em meio de cultura contendo 20µM de álcool alílico. Sofer & Hatkoff (1972) também utilizaram álcool alílico adicionado ao meio de cultura de larvas para obtenção de variantes de *Drosophila spp* deficientes em ADH. Widholm & Kishinami (1988) selecionaram uma linhagem estável de células de *Nicotiana plumbaginifolia* tolerante a 20 µM de álcool alílico. A tolerância foi devido a redução de 50% da atividade da ADH

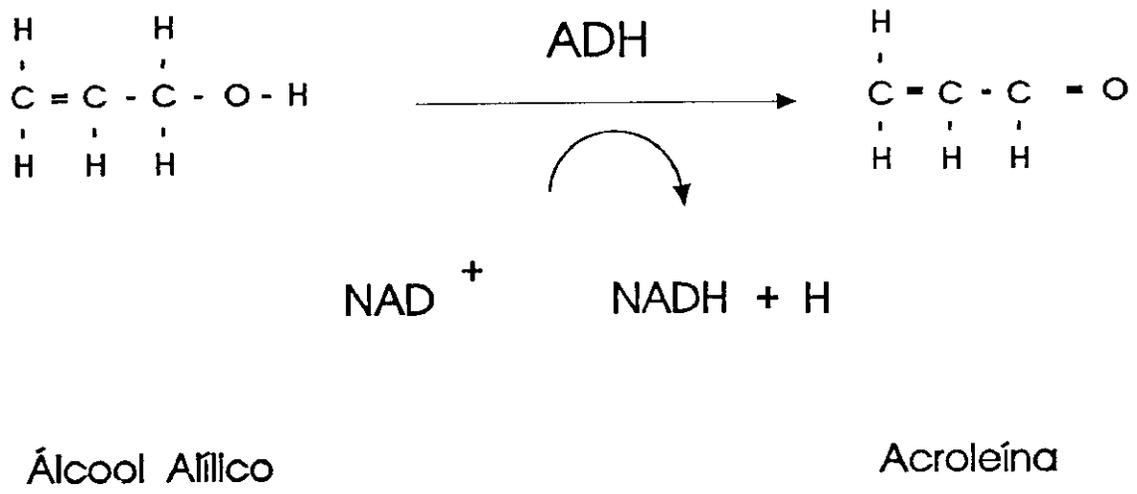


Figura - 1 Reação de catalização da oxidação do álcool alílico ao aldeído acroleína, pela enzima ADH.

nos extratos celulares e a perda de duas das três isoenzimas de ADH normalmente ativas.

Mutantes ADH-0 de milho causados por inserção ou excisão de elementos de transposição, têm sido obtidos através de seleção de grãos de pólen tratados com álcool alílico. Foram selecionadas 6 sequências de DNA inseridas no gene da Adh1. Todas as inserções, as quais representam três famílias: 1) Mu [S3034 (Alleman & Freeling, 1983); S4477, S4478 (Stromer et al., 1982) e 3F1124 (Freeling & Bennett, 1985)], 2) Ds [Fm335 (Peacock, et al., 1983) e 2F11 (Döring et al., 1984)] e 3) Bs1 [S5446 (Mottinger et al., 1984)], reduzem parcial ou totalmente a expressão do gene Adh1 nas plantas. Cada alelo mutante tem sido testado quanto à sua estabilidade gênica, atividade enzimática, quantidade de ADH, presença e tamanho do mRNA, indutibilidade anaeróbica e alterações nos mapas de restrição. Esses estudos mostraram que as inserções também podem alterar o processamento do mRNA ou afetar a sua transcrição, porém, nenhuma delas altera a resposta gênica a indução anaeróbica ou sua regulação durante o desenvolvimento (Freeling, 1984).

1.4 - Sistema ADH em milho

Estudos sobre a resposta anaeróbica em milho mostraram que, a atividade da ADH aumenta quando as plântulas são submersas em água, refletindo a expressão simultânea dos dois genes Adh1 e Adh2, (Hageman & Flesher, 1960). Schwartz (1969) demonstrou que a atividade da ADH é necessária para permitir que as sementes e plântulas sobrevivam em condições de alagamento temporário. A ADH é sintetizada em grandes quantidades em condições de anaerobiose. Nestas condições, ela é responsável pela reciclagem do NAD^+ durante a anoxia.

No milho foram descritos dois loci para a ADH. O locus Adh1, localiza-se no braço longo do cromossomo 1, enquanto que o locus Adh2 está localizado no braço curto do cromossomo 4 (Birchler, 1980). Cada um dos loci codifica

polipeptídeos de aproximadamente 40 KDa, os quais formam dímeros que representam a enzima ativa. A presença de dois loci possibilita a formação de heterodímeros, sugerindo que os dois genes provavelmente se originaram de uma duplicação seguida de pequena divergência (Peacock et al., 1983). Na análise do zimograma da ADH distinguem-se três grupos de isoenzimas. Os dímeros do grupo I, que migram próximo ao ânodo, são compostos apenas de subunidades ADH1, os dímeros do grupo III, que migram mais distantes do ânodo, são compostos apenas de subunidades ADH2 e os dímeros do grupo II, intermediários, são heterodímeros intergênicos que contêm polipeptídeos ADH1 e ADH2 (Schwartz & Endo, 1966; Schwartz, 1966 e Freeling & Schwartz, 1973). Além disso, para o locus da Adh1, são descritos dois isoalelos eletroforéticos naturais, formando bandas do tipo **SS**, **FS** e **FF** (**S** = Slow e **F** = Fast). Para o locus Adh2 se encontra um isoalelo natural (**N**) e um mutante (**P**), formando bandas do tipo **NN**, **NP** e **PP**. Os heterodímeros intergênicos formam bandas do tipo **SN**, **SP**, **FN** e **FP**, (Freeling & Schwartz, 1973). A ADH1 é responsável por aproximadamente 90% da atividade total da enzima em vários tecidos, enquanto que a expressão da ADH2 é melhor observada nas raízes de plântulas induzidas anaerobicamente.

Recentemente, com os novos conhecimentos da biologia molecular em plantas, a ADH em milho tem sido estudada a nível de estrutura e regulação gênica. A Adh1 é um dos loci melhor caracterizado geneticamente em plantas superiores, possuindo variantes e mutantes muito bem caracterizados. Os alelos Adh1-S e Adh1-F diferem entre si em apenas um aminoácido: a substituição do ácido aspártico (**Asp**) pela asparagina (**Asn**), devido a uma mutação de ponto na posição +363 (**GAC** para **AAC**). Foram obtidos clones genômicos da Adh1 que possibilitaram conhecer a sequência completa dos nucleotídeos da região codificadora do gene, e também de algumas regiões adjacentes à sequência codificadora. A comparação de sequências de clones genômicos com as de clones de cDNA mostrou que existem nove introns presentes na região codificadora do gene. Cada intron contém sinais de extremidades **GT/AG**, os quais têm sido encontrados em todas as junções intron/exon dos eucariotos. As sequências adjacentes às junções dos introns da Adh1 são similares às aquelas

encontradas em outras plantas, e se assemelham àquelas descritas em genes animais. As únicas diferenças são as substituições de **G** por **C** e que os introns da Adh1 são ricos em pares de base **AT** (Dennis et al., 1984).

Na região 5' do gene da Adh1 encontra-se a sequência **CAT** que sinaliza o início da transcrição gênica (sítio **CAP**). Acima desse ponto localizam-se as sequências regulatórias **CCAAT** e **TATAA** nas posições -96 e -37 respectivamente. Na posição + 101, dentro do primeiro exon, localiza-se o sítio **ATG** que sinaliza o início da tradução. Na região 3', no último exon, encontra-se o sítio **TAG** indicador do término da transcrição, seguido pelo sítio **poli(A)⁺** de adenilação do mRNA. A disposição da estrutura gênica e posições dos sítios codificadores de início e término da transcrição e tradução são muito similares àqueles presentes nos genes de outros eucariotos (Figura - 14) (Peacock et al., 1983, Freeling, 1984 e Dennis et al., 1984).

No presente trabalho utiliza-se o sistema gênico da ADH como modelo de análise da variação somaclonal em cultura de tecidos de milho. Tendo-se amplo conhecimento desse sistema é possível a obtenção de linhagens estáveis de células ADH-deficientes, através da utilização do álcool alílico em meio de cultura de milho. Com a caracterização desses somaclones, a níveis bioquímicos, moleculares e genéticos, é possível fazer inferências com relação à origem e natureza da variação somaclonal.

2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi dar uma contribuição para o conhecimento da origem e natureza da variação somaclonal em milho. A variação somaclonal tem sido mais abordada a nível de alterações em características morfológicas, sejam quantitativas, como produtividade, resistência a herbicidas, etc. ou qualitativas, como mutantes de endosperma, albinos, estriados, etc.

O gene que codifica a enzima ADH1, por ser um gene conhecido e estudado, prestou-se neste trabalho a avaliações mais precisas e imediatas, no sentido de evidenciar os mecanismos que estariam envolvidos na origem da variação somaclonal. Para isso foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1 - Padronização eletroforética dos isoalelos da ADH nas linhagens de milho do banco de germoplasma de milho da UNICAMP, para se ter uma avaliação do polimorfismo isoenzimático em materiais tropicais.

2 - Caracterização eletroforética da ADH nas linhagens de calos embriogênicos friáveis, estabelecidas em nosso laboratório. O objetivo desta caracterização foi averiguar a expressão da isoenzima em cultura de tecidos.

3 - Transferência do gene mutante Adh1-2F11, que contém uma inserção do elemento de transposição Ds no gene que codifica a ADH1, para a linhagem CAT-100-1, melhor adaptada às condições tropicais. As progênies desse material foram utilizadas como controle negativo para a atividade ADH e nos experimentos de hibridização de DNA "Southern blotting", como controle de alteração do peso molecular do gene da Adh1.

4 - Desenvolver um sistema eficiente de seleção de células ADH-deficientes em cultura de tecidos de milho.

5 - Obter linhagens de calos embriogênicos friáveis ADH-deficientes em cultura de longa duração.

6 - Estudar aspectos fisiológicos, a nível enzimático, das linhagens ADH-deficientes.

7 - Avaliar as alterações moleculares que estariam afetando a expressão gênica da ADH1 nas linhagens de calos mutantes, tanto a nível de tradução, quanto a nível de transcrição gênica.

8 - Avaliar o possível envolvimento de elementos de transposição como geradores de variação somaclonal em milho.

9 - Demonstrar a ocorrência da variação somaclonal, especificamente para o gene da ADH1 nas linhagens de calos ADH-deficientes.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material biológico

3.1.1 - Linhagens de milho

Para a determinação do padrão eletroforético dos isoalelos da ADH1, foram avaliadas as linhagens homozigóticas de milho do Banco de Germoplasma do Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas. Parte das linhagens foram derivadas de dois germoplasmas: Raça Cateto, que tem como característica, sementes de tipo "flint", adaptada ao Sul da Costa Atlântica do Brasil; Raça Tuxpeño, que tem como característica sementes do tipo "dentada" e foi adaptada às baixas altitudes da Costa Atlântica do México. As linhagens de milho "Cuban Yellow Dente" são derivadas das variedades Dentadas originárias das Antilhas. As linhagens da variedade Sintética SRR DURO são compostas de germoplasma da Raça Cateto e variedades das Antilhas. A linhagem CDwxwx é derivada da variedade Sintética Composto Duro pertencente a Raça Cateto. As linhagens "Coastal Tropical Flint" são derivadas da Variedade das Antilhas. Todas as linhagens utilizadas encontram-se relacionadas na Tabela - 1.

abela - 1 Linhagens homozigóticas de milho avaliadas quanto ao padrão eletroforético da ADH em gel de amido-12%.

inhagem	origem(Raça)	endosperma
CAT100-1	Cateto S. Simão*	Flint
CAT100-2	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-3	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-4	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-5	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-6	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-7	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-8	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-9	Cateto S. Simão	Flint
CAT100-10	Cateto S. Simão	Flint
Ast-1	Tuxpeño**	Dente
Ast-2	Tuxpeño	Dente
Ast-3	Tuxpeño	Dente
Ast-4	Tuxpeño	Dente
Ast-5	Tuxpeño	Dente
Ast-6	Tuxpeño	Dente
CYD-1	Cuban Yellow Dente	Dente
CYD-2	Cuban Yellow Dente	Dente
CYD-3	Cuban Yellow Dente	Dente
CYD-4	Cuban Yellow Dente	Dente
CYD-5	Cuban Yellow Dente	Dente
CYD-6	Cuban Yellow Dente	Dente
Tux100-1	Tuxpeño	Dente
Tux100-2	Tuxpeño	Dente
Tux100-3	Tuxpeño	Dente
Tux100-4	Tuxpeño	Dente
Tux100-5	Tuxpeño	Dente
Tux100-6	Tuxpeño	Dente
SRRDURO-1	SRR DURO	Flint
SRRDURO-2	SRR DURO	Flint
SRRDURO-3	SRR DURO	Flint
SRRDURO-4	SRR DURO	Flint
CDWxWx-1	Composto Duro	Flint
Ctf-1	Coastal Tropical Flint	Flint
Ctf-2	Coastal Tropical Flint	Flint
Ctf-3	Coastal Tropical Flint	Flint
Ctf-4	Coastal Tropical Flint	Flint
Ctf-5	Coastal Tropical Flint	Flint
Ctf-6	Coastal Tropical Flint	Flint
Ctf-7	Coastal Tropical Flint	Flint

*Raça autóctone de milho flint adaptado ao sul da Costa Atlântica do Brasil.

**Raça de milho dente adaptado a baixas altitudes da Costa Atlântica do México.

A linhagem de milho norte americana Adh1-2F11 (Freeling & Cheng, 1978; Döring, H-P. et al., 1984), foi gentilmente cedida pelo Dr. Freeling da Universidade da Califórnia, Berkely. Essa linhagem foi utilizada neste trabalho como controle negativo para determinação do padrão eletroforético da ADH e também como controle para a identificação de mutantes causados por transposição. Embriões induzidos anaerobicamente e testados com relação à presença da enzima ADH em gel de amido 12%, não apresentaram atividade enzimática mesmo utilizando-se 200 vezes mais proteína do que extratos de plantas normais. A ausência de atividade da ADH no mutante Adh1-2F11 é devido a presença de uma inserção de 1,3 Kb do elemento Ds, no quarto intron do locus da Adh1 (Döring et al., 1984).

Sementes da linhagem de milho A188 foram gentilmente cedidas pelo Dr. R. Phillips, Universidade de Minnesota, USA. Essa linhagem, que contém o alelo Adh1-F (Brettell et al., 1986), foi utilizada para comparar o padrão de bandejamento da ADH das linhagens tropicais em relação à linhagem norte americana.

3.1.2 - Calos embriogênicos friáveis

No presente trabalho utilizou-se a linhagem de calos embriogênicos friáveis CAT100-1, estabelecida em nosso laboratório a partir da linhagem de milho CAT-100-1. Essa linhagem de calos foi utilizada para seleção de mutantes ADH-deficientes, investigação da expressão gênica e determinação do padrão eletroforético da ADH em calos de milho.

3.1.3 - Plasmídio pH2.3

O clone pH2.3, derivado do plasmídio pH428 (Bennetzen et al. 1984), foi gentilmente cedido pelo Dr. Peter Starlinger, Universidade de Cologne, Alemanha. Esse clone corresponde aproximadamente a 80% do gene estrutural da Adh1 de milho (Figura - 2), e está localizado como um inserto de 2,3 Kb no sítio Hind III do plasmídio pBR322. Este plasmídio é mantido na bactéria *E. coli* HB 101.

3.2 - Preparação de material e normas de esterilidade

3.2.1 - Vidraria e material descartável

De um modo geral, durante o trabalho foi de fundamental importância manter a integridade das moléculas de DNA e/ou RNA e a pureza das culturas nos estudos envolvendo biologia molecular. Desta forma, todo material de vidro utilizado nos experimentos foi esterilizado e/ou livre de RNase. Os materiais foram diferenciados para esterilização de microrganismos, DNase e RNase, pois as RNases são enzimas de atividade muito elevada e resistentes às condições ambientais extremas.

Para se obter material de vidro livre de RNase fez-se uma esterilização a 200°C durante no mínimo 6 horas. O material de plástico, estéril, foi preparado a partir de estoques que nunca tinham sido manipulados sem luvas, pois a pele é uma das principais fontes de contaminação por RNase. O material de vidro ou de plástico não estéril, foi esterilizado através de autoclavagem a 120°C e 1 Kgf/cm², durante 30 minutos.

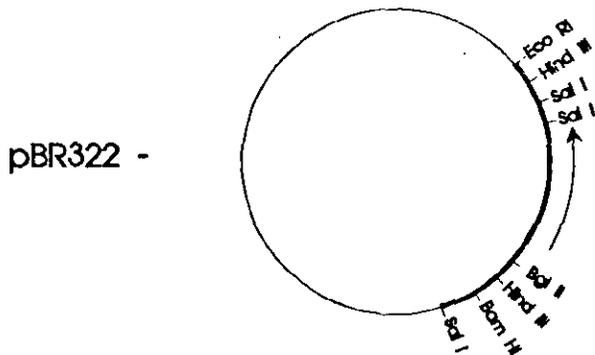
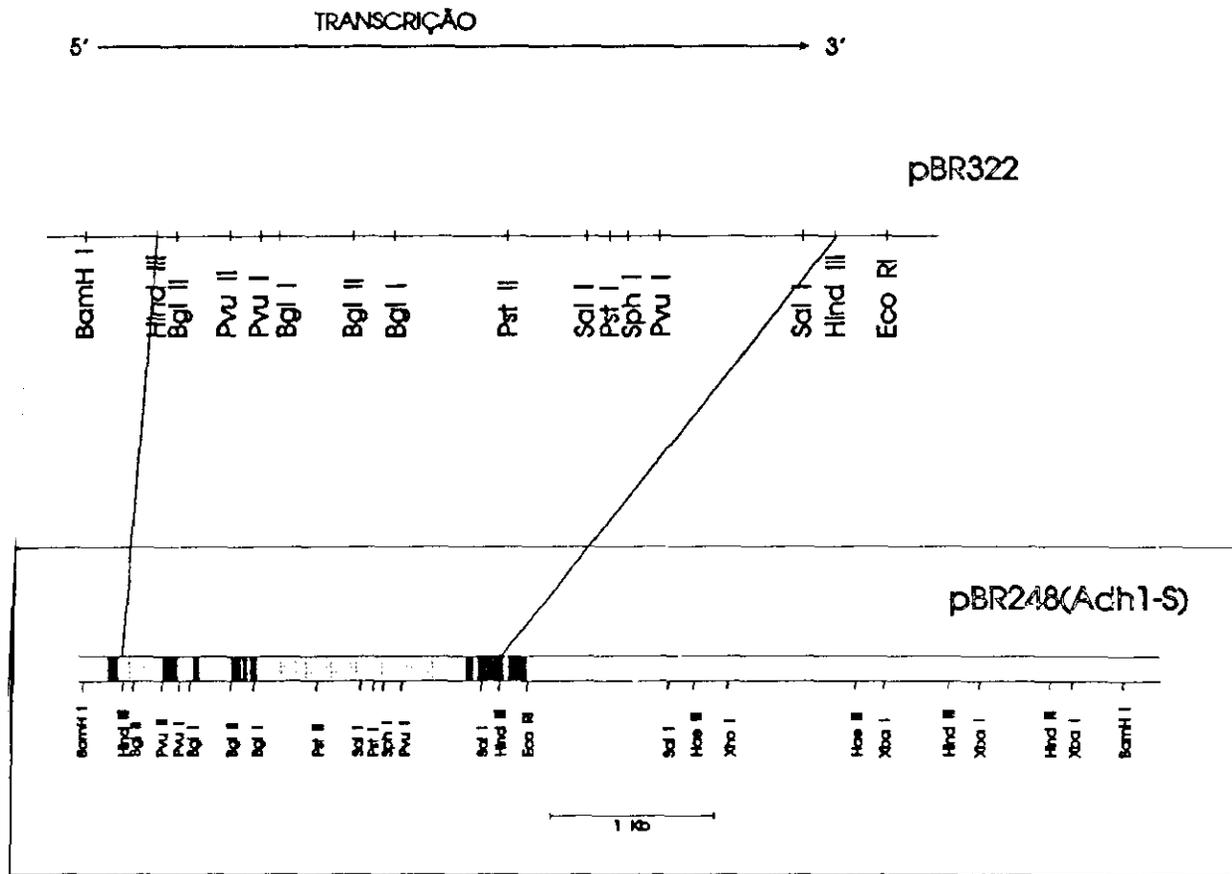


Figura - 2 Mapa dos sítios de restrição de um fragmento da Adh1-S de milho clonado em pBR322. A região correspondente ao clone de 2,3 Kb Hind III Hind III, que está indicada na parte superior da figura, foi derivada do clone de 11,5 KB contido no plasmídeo pB428 (Adh1-S) (Bennetzen et al., 1984). Os espaços preenchidos em preto representam os exons e os pontilhados representam os introns conforme descrito por Peacock et al. (1983).

3.2.2 - Reagentes

Para o preparo de soluções e meios de cultura utilizou-se água ultra pura. Obteve-se esta água através de destilação e filtragem em purificador de água "MILLI Q" (Millipore). A resistividade final da água sempre foi de 18 Mohms/cm e antes da utilização a água foi esterilizada por autoclavagem a 120°C e 1 Kgf/cm² durante 30 minutos.

As soluções para o trabalho com RNA foram preparadas com água livre de RNase, em material de vidro esterilizado, a partir de produtos que foram manipulados o tempo todo com luvas. A água livre de RNase foi obtida de acordo com o seguinte procedimento:

- Coletar a água ultra pura em material de vidro livre de RNase.
- Esterilizar por autoclavagem durante 30 minutos a 120°C e 1Kg/cm².
- Adicionar 1ml de dietilpirocarbonato (DEPC) por litro de água e agitar vigorosamente.
- Aquecer a 37°C durante a noite para eliminar o DEPC na forma de gás carbônico.
- Esterilizar por autoclavagem por 30 minutos a 120°C e 1Kg/cm². Manipular sempre com luvas.

Os reagentes empregados foram sempre de qualidade analítica (Merck, Sigma, Pharmacia, etc.). Aqueles mais específicos estão listados a seguir:

Produto	Fabricante	Referência
Acetato de sódio	Merck	6267
Ácido abscísico	Sigma	A-1049
Ácido ascórbico	Sigma	A-2174
Ácido acético	Merck	0063
Ácido p-aminobenzóico	Sigma	A-1174
Ácido bórico	Sigma	B-9645
Ácido cítrico	Merck	244
Ácido 2,4 diclorofenoxi- acético (2,4D)	Sigma	D-8407
Ácido etilenodiaminotetra- acético (EDTA)	Sigma	E-6635
Ácido fólico	Sigma	F-8890
Ácido nicotínico	Sigma	N-0765
Ácido retinóico (Vit. A)	Sigma	R-262
Agarose NA	Pharmacia	17-0554-02
Albumina bovina (BSA) V	Sigma	A-6918
Álcool alílico	Riedel	60020
Amido hidrolisado de batata	Sigma	S-4501
Ampicilina	Sigma	A-9518
L(+)Arginina	Sigma	A-5006
L(+)Asparagina	Sigma	A-4159
Azul de bromofenol	Riedel	32712
Bacto-Agar	Difco	0140-01
Bacto-levedura	Difco	0127-01
Bacto-triptona	Difco	0123-01
d-Biotina	Sigma	B-3399

Brometo de etídio	Sigma	E-8761
Cloreto de cálcio	Sigma	C-2661
Cloreto de céσιο	Pharmacia	17-0846-06
Cloreto de cobalto	Sigma	C-2911
Cloreto de colina	Sigma	C-1879
Cloranfenicol	Sigma	C-0378
Coomassie blue G250	Sigma	B-1131
Colecalciferol (Vit. D ₃)	Sigma	C-2653
Cyanocobalamina (Vit. B ₁₂)	Sigma	V-6629
Dietilpirocarbonato (DEPC)	Fluka	32490
Dimetilriazol difenilte- trazólio brometo (MTT)	Sigma	M-2128
Ditiotreitol (DTT)	Sigma	D-0632
DNA de esperma de salmão	Sigma	D-1626
Etanol	Merck	983
Espermidina	Sigma	S-2501
Extrato de levedura	Difco	1515-17
Fenol	Ecibra	081
Fenazina metosulfato (PMS)	Sigma	P-9625
Ficol 400	Pharmacia	17-0400-01
Formaldeído 37%	Merck	9684
Formamida	Sigma	F-7503
Fosfato de amônio	Sigma	A-3048
Fosfato de potássio	Sigma	P-8416
Glicerina	Ecibra	830
Glicina (Glicocol)	Sigma	G-6143
d(+) Glucose	Sigma	G-7520
L(+)Glutamina	Fluka	49420
HEPS	Sigma	H-3375
Hidróxido de lítio	Merck	5691
Hidrocloreto de tiamina	Sigma	T-4625
Iodeto de potássio	Sigma	P-8166

Isotiocianato de guanidina	Fluka	50990
d-Manitol	Sigma	M-1902
Lauril sarcosinato de sódio	Sigma	L-5125
mio-Inositol	Sigma	I-3011
MES	Sigma	M-8652
Metanol	Merck	6009
Molibdato de sódio	Sigma	M-1651
MOPS	Sigma	M-9381
Nicotinamida	Sigma	N-0636
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Sigma	N-7004
Nitrato de amônio	Sigma	A-3795
Nitrato de potássio	Sigma	P-8291
d-Pantotenato de cálcio	Sigma	P-6045
Phytigel	Sigma	A-3301
Piridoxina	Sigma	P-8666
Polietilenoglicol 6000	Merck	807491
Polivinilpirrolidona	Sigma	PVP-40
Riboflavina	Sigma	R-9881
Sacarose	Sigma	S-5391
Sódio-dodecil sulfato	Sigma	L-5750
Sephadex G25 Fine	Pharmacia	17-0060-02
Sephadex G50	Pharmacia	17-0573-02
Sulfato de amônio	Sigma	A-3920
Sulfato de cobre	Sigma	C-3036
Sulfato ferroso	Sigma	F-8263
Sulfato de magnésio	Sigma	M-8150
Sulfato de manganês	Sigma	M-7899
Sulfato de zinco	Sigma	Z-1001
Trisma base	Sigma	T-1503
Tiamina	Sigma	T-3902

3.2.3 - Enzimas e "kits"

3.2.3.1 - Enzimas de restrição e modificação empregadas

Enzima	Fabricante	Referência	Concentração
DNA polimerase I	Biolabs	#20	10U/ul
DNA polimerase I klenow	Biolabs	#210	5U/ml
DNAse I	Boehringer	104159	5U/ml
DNA ligase	NEN	#133	5U/ml
Lisozima	Sigma	L-6876	25U/ml
Eco RI	Amersham	TH1040x	25U/ml
Hind III	Amersham	TH1060x	25U/ml
Ribonuclease	Pharmacia	27-0316-02	65U/ml

3.2.3.2 - "Random-primer"

"Multiprime DNA Labelling System Amersham RPN,1600Y".

3.2.4 - Membranas

3.2.4.1 - Membrana "Hybond-mAP"

"Messenger affinity paper, Amersham RPN-1513".

3.2.4.2 - Membrana Hybond-N

"Nylon Hybridization, 0,45 Micron, Amersham RPN-203N".

3.2.4.3 - Membrana DEAE-celulose

Papel DEAE-celulose (DE81), Whatman 3658023.

3.2.4.4 - Membrana de diálise

"Dialysis tubing, Sigma D-9277".

3.2.5 - Soluções estoques de uso geral

Estoque	Preparação	Observações
Ácido abscísico (26ug/ml)	26ug/ml de KOH (1M)	Conservar a -20°C
Ácido bórico (2,58uM)	0,08g/l de água	Conservar a 5°C

Ácido nicotínico (0,37mM)	0,46g/l de água	Conservar a -20°C
Albumina bovina	10mg/10ml de solução salina 0,8%	Conservar a -20°C
d-Biotina (Vit. H) (0,82mM)	10mg/50ml de KOH (0,1M)	Conservar a 5°C
Brometo de Etídio	10 mg/ml de água	Conservar a 5°C
Cloreto de cálcio (0,57M)	6,27g/l de água	Conservar a 5°C
Cloreto de colina (7,16mM)	25mg/25ml de água	Conservar a 5°C
Cloreto de cobalto (0,1uM)	1mg/l de água	Conservar a 5°C
Colecalciferol (4mM)	50mg/25ml de água	Filtrar 0,22um Conservar a 5°C
Coomassie Blue	0,6g/l de ácido perclórico 3%	Filtrar
Cyanocobalamina (1,5mM)	10mg/50ml de água	Conservar a 5°C

2,4D	1,65mg/ml de KOH 0,1M	Conservar a -20°C
EDTA (0,005M)	1,86g/l de água	Conservar a 5°C
Fosfato de potássio (0,40M)	20,00g/l de água	Conservar a 5°C
Glicina (0,9mM)	0,1g/l de água	Conservar a -20°C
Inositol (27,50mM)	4,95g/l de água	Conservar a -20°C
Iodeto de potássio (0,48uM)	0,04g/l de água	Conservar a 5°C
Molibdato de sódio	0,001g/l de água	Conservar a 5°C
Nitrato de amônio (1,03M)	82,50g/l de água	Conservar a 5°C
Nitrato de potássio (13,99M)	141,50g/l de água	Conservar a 5°C
d-pantotenato de cálcio (4,4mM)	25mg/25ml de água	Filtrar 0,22um Conservar a 5°C

Piridoxina (0,37mM)	0.96g/l de água	Conservar a -20°C
Tiamina (0,75mM)	2,53g/l de água	Conservar a -20°C
Riboflavina (Vit. B ₁₂) (2,65mM)	10mg/10ml de água	Conservar a 5°C
Sulfato de amônio (1,75M)	23,15g/l de água	Conservar a 5°C
Sulfato de cobre (0,1uM)	0,0001g/l de água	Conservar a 5°C
Sulfato de ferro (0,005M)	1,39g/l de água	Conservar a 5°C
Sulfato de magnésio (0,38M)	4,52g/l de água	Conservar a 5°C
Sulfato de manganês (19,70uM)	0,17g/l de água	Conservar a 5°C
Sulfato de zinco (5,20uM)	0,08g/l de água	Conservar a 5°C

3.2.6 - Meios de cultura

3.2.6.1 - Bactérias

Meio	Preparação	Observações

Meio de cultura LB:		
Bactotripton 2%	20g de bactotripton	Autoclavar a
Extrato de levedura 1%	10g de extrato de levedura	120°C 20 minutos
Cloreto de sódio 2%	20g de NaCl em	Ajustar o pH 7,4
	1 litro de água.	NaOH 10N

3.2.6.2 - Cultura de tecidos

O meio de cultura para obtenção e manutenção de calos embriogênicos friáveis (CM-1) é constituído dos sais N₆ (Chu, 1975) acrescido de vitaminas e fitohormônio conforme descrito na Tabela - 2.

O meio de cultura líquido para obtenção de microcalos (SM-1) tem a mesma composição do meio CM-1 acrescido das vitaminas, aminoácidos e fitohormônio conforme descrito na Tabela - 3.

Tabela - 2 Composição do meio CM-1 de manutenção de calos embriogênicos friáveis.

Substância	[mg/l]	[g/l]	[mM]	[uM]
Inorgânicos (sais N₆)				
(NH ₄) ₂ SO ₄	463,00		3,50	
KNO ₃	2830,00		27,98	
CaCl ₂ .2H ₂ O	166,00		1,13	
MgSO ₄ .6H ₂ O	171,50		0,75	
KH ₂ PO ₄	400,00		2,90	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80		0,10	
Na ₂ -EDTA	37,20		0,10	
MnSO ₄ .H ₂ O	3,34			19,70
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,50			5,20
H ₃ BO ₃	1,60			5,80
KI	0,80			4,80
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25			1,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025			0,10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025			0,10
Orgânicos:				
Glicina-HCl	2,00			18,00
Mio-inositol	100,00			555,00
Thiamina-HCl	5,06			15,00
Acido nicotínico	0,92			7,50
Piridoxina-HCl	1,54			7,50
2,4 D	1,65			7,50
Sacarose		30,00	87,60	
Phytigel		2,40		

O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem. O meio de cultura foi autoclavado a 120°C 1Kgf/cm², durante 20 minutos e em seguida distribuído em placas de Petri estérís, colocando-se aproximadamente 20 ml por placa.

Tabela-3 Composição do meio líquido para obtenção de microcalos:SM-1.

Substância	[mg/l]	[g/l]	[mM]	[uM]
Inorgânicos (sais N₆)				
(NH ₄) ₂ SO ₄	463,00		3,50	
KNO ₃	2830,00		27,98	
CaCl ₂ .2H ₂ O	166,00		1,13	
MgSO ₄ .6H ₂ O	171,50		0,75	
KH ₂ PO ₄	400,00		2,90	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80		0,10	
Na ₂ -EDTA	37,20		0,10	
MnSO ₄ .H ₂ O	3,34			19,70
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,50			5,20
H ₃ BO ₃	1,60			25,80
KI	0,80			4,80
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25			1,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025			0,10
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025			0,10
Orgânicos (vitaminas KM-8p):				
Mio-inositol	100,00			555,00
Thiamina-HCl (vit. B ₁)	1,00			2,9
Nicotinamida (vit. A)	1,00			8,12
Piridoxina-HCl (vit. B ₆)	1,00			4,80
D-pantotenato de cálcio	1,00			4,19
Ácido fólico	0,40			0,91
Ácido p-aminobenzóico	0,02			0,15
d-biotina (vit. H)	0,01			0,04
Cloreto de colina	1,00			7,16
Riboflavina (vit. B ₂)	0,20			0,53
Ácido ascórbico (vit. C)	2,00			10,10
Ácido retinóico (Vit. A)	0,01			0,03
Cholecalciferol sulf(Vit. D ₃)	0,01			0,02
Cianocobalamina (Vit. B ₁₂)	0,02			0,02
Aminoácidos				
L asparagina	25,00			198,25
L glutamina	25,00			171,12
L arginina	25,00			143,51
L glicina	10,00			133,21
Acido abscisico	0,026			0,10
2,4 D	1,65			7,50
MES	976,00		5,00	
Glicose		5,00	2,77	
Sacarose		15,00	43,80	

O pH foi corrigido para 5,2 e autoclavado a 120°C, 1Kgf/cm², durante 20 minutos. As vitaminas, os reguladores de crescimento e os aminoácidos foram filtrados através de membrana filtrante estéril, poro 0,2 um (Millipore JBR610021) e adicionados ao meio após a autoclavagem e resfriamento.

3.3 - Eletroforese

3.3.1 - Preparo das amostras a partir de escutelos induzidos

O escutelo foi utilizado como fonte principal para obtenção da enzima ADH nos experimentos de eletroforese, visto que, através de indução anaeróbica, a concentração da mesma é muito elevada neste tecido (Schwartz, 1966).

Procedimento:

1. Submergir 10 sementes em água destilada.
2. Incubar durante 12 horas a 30°C para a indução enzimática.
3. Com auxílio de bisturi, remover aproximadamente 10 mg de cada escutelo e transferir para tubo de homogeneização.
4. Adicionar 10 ml de Tampão de Homogeneização pH 6,8 gelado.
5. Manter a amostra em banho de gelo.
6. Homogeneizar utilizando um homogeneizador "Polytron".
7. Filtrar em gaze.
8. Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Foi utilizado uma centrífuga Beckman J21.
9. Recolher o sobrenadante.

Soluções:

Tampão de homogeneização pH 6,8:

Trisma base 62mM

glicerol 20%

DTT 1mM

3.3.2 - Preparo das amostras de calos e/ou microcalos.

O procedimento de preparo das amostras de calos e/ou microcalos para eletroforese da enzima ADH foi semelhante ao descrito para escutelo. A única diferença consistiu em utilizar o tecido diretamente, não sendo necessária a indução anaeróbica.

3.3.3 - Eletroforese em gel de amido

A eletroforese da ADH neste trabalho foi realizada em gel de amido montado horizontalmente em placas de 18 x 21 cm, utilizando um sistema descontínuo de tampões (Cardy et al., 1983).

Procedimento:

a.Preparação do gel:

- 1.Pesar a quantidade suficiente de amido para montagem do gel a 12%.
- 2.Transferir o amido para um "kitassato".
- 3.Adicionar sacarose suficiente para 4,3% do gel.

4. Adicionar Tampão do Gel pH 8,3.

5. Solubilizar a sacarose.

6. Aquecer diretamente ao fogo sob agitação.

7. Após a fervura, cessar o aquecimento e aplicar vácuo ao frasco deixando borbulhar vigorosa e rapidamente.

8. Verter sobre a cuba.

9. Deixar esfriar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora.

10. Resfriar o gel durante 15 minutos a 4°C.

11. Embeber retângulos de papel Whatman 3MM (3 x 5 mm) no extrato e inserir no gel.

b. Corrida:

12. Adicionar 250 ml de Tampão do Eletrodo pH 8,3 em cada reservatório.

13. Submeter o gel a uma diferença de potencial de 14 V/cm durante 6 a 8 horas, a 4°C, não deixando que a corrente ultrapasse 40 mA, o que poderia aquecer o gel e inativar a enzima.

c. Visualização das bandas de ADH:

14. Após a eletroforese, desmontar o sistema e transferir o gel para a cuba de revelação.

15. Adicionar:

- 100 ml de Tampão de Coloração (Tris-HCl 100 mM pH 8,5)

- 1 ml de Etanol
- 1 ml de NAD 1 M
- 1 ml de MTT 0,8 M
- 1 ml de PMS 0,2 M

16. Incubar durante 30 minutos a 30°C.

17. Interromper a revelação adicionando 50 ml de Fixador.

18. Lavar com água destilada após 20 minutos.

19. Fotografar com filme Panatomic-x ASA 32 (Kodak).

Soluções:

Tampão do Gel pH 8,3:

9 partes de Tampão Tris-Citrato

1 parte de Tampão do Eletrodo pH 8,3

Tampão Tris-Citrato:

Trisma-Base 0,005M

Ácido Cítrico 0,007M

Tampão do Eletrodo pH 8,3:

Ácido bórico 0,19 M

Hidróxido de lítio 0,04M

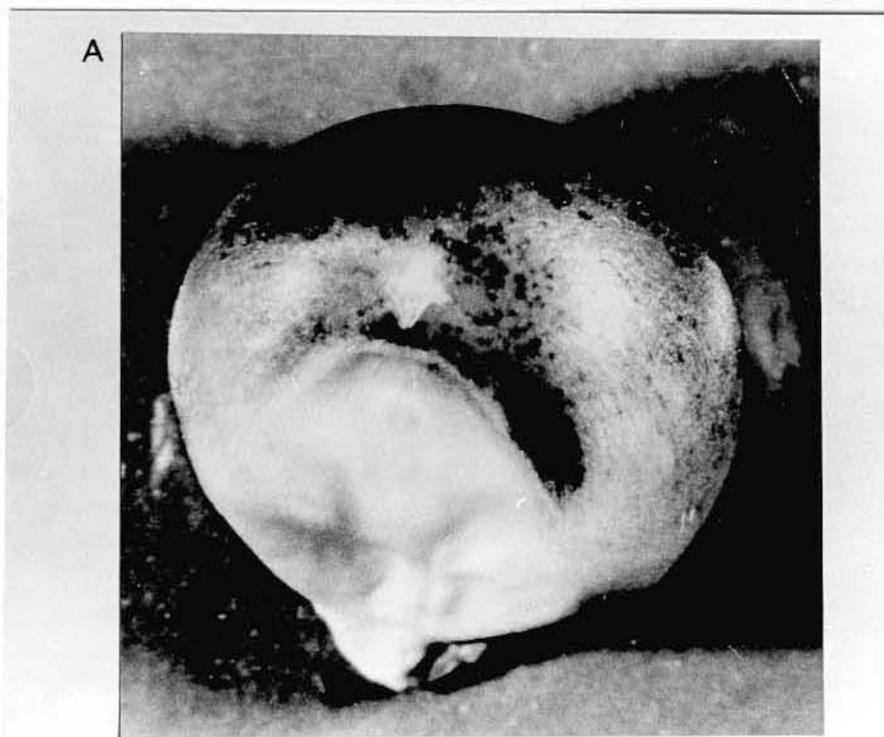
3.4 - Transferência do gene Adh1-2F11 para a linhagem CAT-100-1

Devido as dificuldades de reprodução do material norte americano no Brasil, o gene Adh1-2F11 (Figura - 3) foi transferido através de cruzamento e sucessivos retrocruzamentos para a linhagem CAT-100-1, melhor adaptada às condições tropicais. Sementes da linhagem CAT-100-1 e da linhagem Adh1-2F11 foram plantadas na área experimental pertencente a UNICAMP. Uma diferença de 25 dias foi mantida entre o plantio da linhagem CAT-100-1 e da linhagem Adh1-2F11 devido a precocidade do material norte americano quando plantado em regiões tropicais. Assim foi possível que o florescimento das duas linhagens fossem coincidentes, possibilitando a realização dos cruzamentos. Como o fenótipo recessivo do mutante Adh1-2F11 só pode ser detectado através da revelação da atividade da ADH, utilizou-se o método de "dot blot" (descrito no item 3.10.1), para análise das progênies dos retrocruzamentos. Sementes das progênies negativas para atividade da ADH foram plantadas e retrocruzadas para a linhagem CAT-100-1 durante 4 gerações.

3.5 - Obtenção de calos embriogênicos friáveis

Procedimento:

1. Plantar a linhagem CAT-100-1 em campo *experimental*.
2. Coletar as espigas 12 a 15 dias após a polinização.
3. Descascar e esterilizar superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio 5% contendo 0,001% de Tween-20 durante 15 minutos.



B UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO

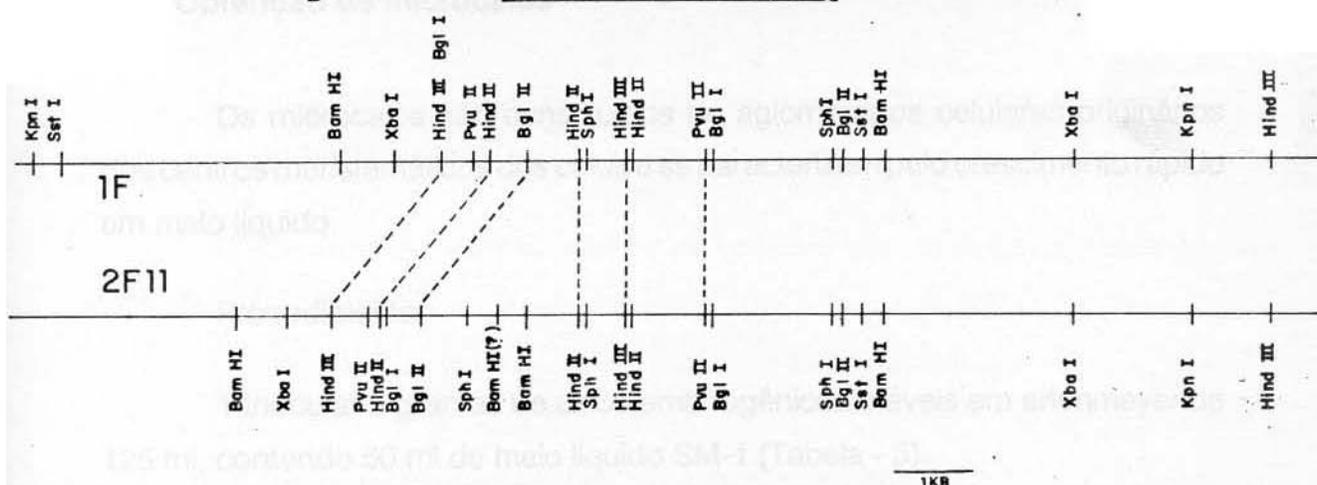


Figura - 3 Linhagem de milho norte americana Adh1 - 2F11 - ADH1-0. (A) Fenótipo bronze-variegado. O fenótipo bronze é dado pela homozigose do alelo recessivo bz2-m e as manchas pretas na camada de aleurona são setores recessivos (bz2-m bz2-m) que reverteram para o dominante (Bz $_$). A variegação é causada pela excisão do elemento Ds do gene bronze e a presença do elemento Ac em local desconhecido no genoma. (B) Mapa dos sítios de restrição do gene da Adh1 para os alelos Adh1-F e Adh1-2F11. O mutante Adh1-2F11 originou-se devido a inserção espontânea, do elemento Ds no quarto exon da Adh1.

4. Lavar as espigas várias vezes com água destilada estéril. 5. Excisar os embriões imaturos com aproximadamente 1,5 mm de comprimento e inocular em meio de cultura CM-1 (Tabela - 2).

7. Incubar a 26°C no escuro.

8. Selecionar os setores friáveis a partir de calos compactos tipo I, com auxílio de microscópio estereoscópio (8x).

9. Repicar a cada 15 dias até o estabelecimento das linhagens de calos embriogênicos friáveis, quando adquirirem aparência uniforme.

3.6 - Obtenção de microcalos

Os microcalos são constituídos de aglomerados celulares originários dos centros meristemáticos dos calos e se caracterizam pelo crescimento rápido em meio líquido.

Procedimento:

1. Inocular 3 gramas de calos embriogênicos friáveis em erlenmeyer de 125 ml, contendo 50 ml de meio líquido SM-1 (Tabela - 3).

2. Incubar, sob agitação orbital constante de 165 rpm, a 26°C durante 3 dias no escuro.

3. Filtrar inicialmente em uma peneira de 40 mesh.

4. Filtrar em uma peneira de 60 mesh e transferir os microcalos, que ficaram retidos na peneira, para um erlenmeyer.

5. Pipetar 500 µl de microcalos em meio CM-1 e espalhar uniformemente com auxílio de alça de Drigalski-Conradi.

6. Incubar a 26°C no escuro.

3.7 - Inibição do crescimento de microcalos pelo álcool alílico, coeficiente de sobrevivência e I₅₀

Para a determinação do efeito do álcool alílico sobre o crescimento dos microcalos, foram preparados meios de cultura CM-1 contendo 0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 uM de álcool alílico.

Procedimento:

1. Preparar o meio de manutenção CM-1 conforme descrito na Tabela -
2.

2. Deixar o meio esfriar até que a temperatura se aproxime do ponto de gelificação do Phytigel (30°C).

3. Adicionar o álcool alílico na proporção suficiente para as concentrações seletivas.

4. Distribuir em placas de Petri estéreis.

5. Inocular os microcalos previamente preparados.

6. Após a montagem de cada experimento (T₀), contar o número de microcalos inoculados por tratamento, utilizando um microscópio estereoscópio.

7. Avaliar o crescimento dos microcalos após 30 dias (T₃₀). A avaliação do crescimento dos microcalos é feita através da contagem daqueles que sobreviveram ao agente seletivo. Para a contagem dos microcalos não é necessário o auxílio do microscópio estereoscópio, pois nesta fase de crescimento os microcalos têm aproximadamente 10 mg de peso.

A taxa de 50% de inibição (I_{50}) é calculada comparando-se o número de microcalos inoculados com o dos sobreviventes em cada tratamento.

3.8 - Processo seletivo de microcalos de milho

A seleção de linhagens de células tolerantes ao álcool alílico consiste em inocular os microcalos em meio CM-1 contendo álcool alílico nas concentrações que causam ao redor de 80% de inibição.

Procedimento:

- 1.Preparar meio CM-1 acrescido de 0, 35, 40 e 45 μ M de álcool alílico.
- 2.Inocular os microcalos segundo o procedimento descrito anteriormente.
- 3.Avaliar o crescimento vinte dias após o inóculo.
- 4.Submeter os microcalos resistentes ao álcool alílico a avaliação qualitativa da ADH através do método de "dot blot".
- 5.Repicar em meio CM-1, não seletivo, somente os microcalos que não apresentarem atividade de ADH (ADH-deficientes).
- 6.Após 15 dias de crescimento, submeter os microcalos a avaliação qualitativa da ADH através do método de "dot blot".
- 7.Repetir o passo 5 e 6.
- 8.Após, aproximadamente, trinta subculturas, testar os somaclones quanto à tolerância ao álcool alílico e quanto à atividade de ADH em gel de amido-12%.

9. Para análises bioquímica e molecular, ampliar os somaclones considerados tolerantes ao álcool alílico.

3.9 - Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas totais nos extratos foram determinadas pelo método de Bradford (1976), incluindo-se algumas modificações conforme descrito por Sedmark & Grossberg, (1977) na preparação do corante "Coomassie blue". Soluções de albumina sérica bovina foram utilizadas para a determinação da curva padrão. A concentração das soluções de albumina foram determinadas utilizando-se o valor $E_{280}^{1\%} = 6,2$.

3.10 - Determinação da atividade da ADH

3.10.1 - "Dot blot" um método rápido na determinação qualitativa da atividade da ADH

Procedimento:

1. Transferir aproximadamente 10 mg de tecido (escutelo, calos e/ou microcalos) para um tubo Eppendorf.
2. Adicionar 100 μ l de Tampão de Homogeneização pH 6,8.
3. Macerar com bastão de vidro.
4. Centrifugar durante 15 minutos, 4°C, a 15000 rpm em microcentrífuga.
5. Aplicar alíquotas contendo 1 μ l do sobrenadante sobre retângulos de papel Whatman 3MM (9 x 12 cm).
6. Transferir o papel Whatman para uma cuba de revelação.

7. Adicionar 50 ml de Tampão de Coloração (Tris-HCl 100 mM pH 8,5), 0,5 ml de Etanol, 0,5 ml de NAD 1 M, 0,5 ml de MTT 0,8 M e 0,5 ml de PMS 0,2 M.

8. Incubar durante 30 minutos a 30°C.

9. Interromper a revelação adicionando 25 ml de Fixador.

10. Lavar com água destilada após 20 minutos.

11. Fotografar com filme Panatomic-x ASA 32 (Kodak). As amostras que apresentam atividade enzimática coram-se fortemente de azul. As amostras negativas apresentam uma mancha azul-clara fraca resultante do "background".

3.10.2 - Determinação quantitativa da ADH

A atividade da ADH foi medida através do incremento da absorbância a 340 nm, devido a redução do cofator NAD pela ADH do extrato.

Procedimento:

1. Pesar 4 g de calos.

2. Adicionar 10 ml de Tampão de Homogeneização (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, polivinilpirrolidona-40 1%, glicerol 20%), gelado.

3. Manter a amostra em banho de gelo.

4. Homogeneizar utilizando um homogeneizador "Polytron".

5. Filtrar em gaze.

6. Centrifugar a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

7. Separar o sobrenadante e dosar a proteína total.

8. Medir a atividade enzimática em 2 ml de mistura de reação (tris-HCl 150 mM pH 9,0, NAD 0,6 M, etanol 5 mmol) contendo 200 μ l de extrato (Widholm & Kishinami, 1989).

9. Medir as absorbâncias em 340 nm. Uma unidade de ADH é definida como a quantidade de enzima suficiente para catalizar a transformação de 1 μ mol de substrato por minuto a 25°C nas condições do meio de reação. Sabendo-se que $E_{340\text{NADH}} = 6220 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ a atividade enzimática em $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade} = A \times d / 6,22 \times t \text{ (}\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}\text{)}$$

A = Absorbância.

d = fator de diluição.

t = tempo de reação.

3.11 - Determinação de V_{max} e K_m

Procedimento:

O extrato para determinação de V_{max} e K_m foi obtido conforme descrito no ítem 3.10.2.

1. Pipetar 2 ml de Mistura de Reação acrescida de etanol nas concentrações do experimento: 57,8; 115,6; 231,3; 462,5; 925,0; 1.850,0 a 2.775,0 μ mol.

2. Medir a velocidade de reação através de um registrador.

8. Calcular V_{max} e K_m . Os valores das constantes cinéticas, bem como os valores dos desvios padrões destas constantes, no estudo de inibição da ADH, foram calculados segundo o algoritmo descrito por Wilkinson (1961).

3.12 - Determinação da presença de inibidor da ADH

A atividade de um possível inibidor de ADH existente nos somaclones selecionados foi testada pela quantidade de inibição da atividade da ADH em mistura de extrato controle, que apresentavam atividade da enzima, e extratos dos somaclones, conforme descrito por Efron & Schwartz (1968).

Procedimento:

1. Misturar extrato do controle com extrato teste na proporção 1:1.

2. Incubar a temperatura ambiente.

3. Medir a atividade enzimática nos tempos 0, 30 e 60 minutos de incubação. O nível de inibidor da ADH é dado pela inativação do extrato controle e apresentado como unidades de ADH inibida ou porcentagem de inibição da atividade da ADH (Lai & Scandalios, 1982). A perda natural da atividade da ADH durante a incubação deve ser medida através da incubação de extrato controle com a Mistura de Reação na proporção de 1:1.

3.13 - Isolamento de DNA e RNA

3.13.1 - Purificação de DNA genômico.

A purificação de DNA genômico a partir de calos ou plântulas seguiu o método de Rivin et al. (1982).

Procedimento:

1. Lavar 200 sementes de milho com água destilada e incubá-las durante 12 horas em água destilada sob agitação orbital a 27°C.

2. Esterilizar as sementes superficialmente, incubando-as durante 15 minutos em Solução de Cloramina-T 1%.

3. Enxaguar as sementes 6 vezes com água destilada estéril.

4. Germinar as sementes em cubas de acrílico estéreis, contendo vermiculita autoclavada e incubar durante aproximadamente 10 dias em câmara escura 27°C.

5. Coletar as partes aéreas das plântulas, pesar e congelar em nitrogênio líquido.

6. Pulverizar 5 g de calos ou 20 g de plântulas em gral e pistilo pré-resfriados em nitrogênio líquido. Manter o material sempre congelado adicionando nitrogênio.

7. Adicionar 20 ml de Tampão de Extração (DNA) gelado e manter em banho de gelo por 5 minutos. As etapas 7 a 11 devem ser realizadas o mais

rápido possível, portanto é aconselhável trabalhar no máximo com 2 amostras cada vez.

8. Homogeneizar durante 30 segundos a velocidade máxima, utilizando um homogeneizador Superhom. Repetir a homogeneização. Manter a solução em banho de gelo.

9. Filtrar em 3 camadas de gaze estéril.

10. Sedimentar os núcleos através de centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C.

11. Mantendo a amostra em banho de gelo, ressuspender e lisar os núcleos em 5 ml de Tampão de Lise gelado. Se necessário utilizar um bastão de vidro. É importante evitar agitações bruscas na extração do DNA para reduzir ao mínimo a fragmentação mecânica das cadeias de DNA. Deve-se agitar invertendo suavemente o tubo de ensaio.

12. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente e adicionar 0,95 g de CsCl por ml do lisado.

13. Remover as proteínas precipitadas através de centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

14. Adicionar brometo de etídio (10 mg/ml), ao sobrenadante, suficiente para se obter 300ug/ml de solução final.

15. Ajustar a concentração de CsCl (1,55 g/ml) através do índice de refração ($n = 1.3895$).

16. Transferir a amostra para tubo de ultracentrifuga de 4 ml.

17. Ultracentrifugar a 40000 rpm durante 15 horas a 20°C.

18. Coletar a banda de dsDNA, com auxílio de agulha de grosso calibre (30 x 12) e seringa de 1 ml e transferir para tubo de Eppendorf.

19. Remover o brometo de etídio por sucessivas extrações com 1-butanol saturado em água. Realizar extrações até que não mais apareça coloração rósea na fase alcoólica (superior).

20. Transferir a fase aquosa (inferior) para tubo corex e adicionar 2 volumes de água e precipitar o DNA pela adição de 0,6 volumes de isopropanol.

21. Incubar durante 2 horas a -20°C .

22. Centrifugar a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C .

23. Lavar o sedimento com etanol 70% gelado (-20°C). Liofilizar o sedimento.

24. Ressuspender o DNA adicionando 0,5 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Para ressuspender totalmente o DNA é necessário extensiva agitação e muitas vezes a adição de maior volume de TE.

25. Quantificar a concentração de DNA misturando-se 50 μl da amostra com 650 μl de TE e medindo-se a absorbância a 260 nm pela equação abaixo:

$$C = dA \times d \times 50 \text{ ug de DNA.ml}^{-1}$$

dA = absorbância a 260 nm

d = fator de diluição

50 ug de DNA/ml = 1 unidade de densidade óptica

A medida do conteúdo de ácidos nucléicos de uma preparação e sua pureza se obtém mediante a leitura da absorção em UV, sempre supondo que

haja somente DNA e RNA, e que a contaminação por nucleotídeos é desprezível. O espectro de absorção do DNA e do RNA têm no máximo cerca de 258 nm e um mínimo a 230 nm. Por razões práticas os dados equivalentes às concentrações se realizam a 260 nm. Em 280 nm se mede a absorção de anéis aromáticos pertencentes às proteínas. A medida do grau de pureza de DNA ou RNA com relação a proteínas é dada pela relação D.O.260/D.O.280. Considera-se uma boa preparação quando o grau de pureza obtido é de 1,85 para purificação de DNA ou 2,0 para RNA (Maniatis et al., 1982).

26. Comprovar a integridade dos DNAs extraídos através de eletroforese em minigel de agarose 0,5% em Tampão TBE. Utilizar o bacteriófago lambda (50 Kb) como padrão de peso molecular.

27. Conservar a -20°C .

Soluções:

Tampão TBE:

Trisma base 89 mM

Ácido bórico 89 mM

EDTA 2mM

Tampão de Extração (DNA) pH 8,0:

Tris-HCl 50 mM

MgCl₂ 5mM

Tampão de Lise pH 8,0:

Tris-HCl 50 mM

EDTA 20 mM

Sarcosil 1%

3.13.2 - Purificação de RNA

3.13.2.1 - Purificação de RNA total

A purificação de RNA genômico a partir de calos seguiu o método de Siegel & Bresnick (1986).

As ribonucleases (RNAses) são enzimas extremamente ativas e resistentes a condições ambientais drásticas. É importante empregar material de vidro, porcelana e plástico livre de RNAses, bem como reagentes especialmente preparados e manipular sempre o material e amostras com luvas de plástico ou latex.

Procedimento:

1. Triturar 5 g de calos em gral, em presença de nitrogênio líquido.
2. Transferir para tubos de polietileno com tampa de rosca e adicionar 10 ml de Tampão de Extração (RNA) previamente aquecido a 60°C em banho Maria.
3. Incubar em banho Maria a 60°C durante 5 minutos. Agitar com vortex intermitentemente.
4. Adicionar 10 ml de Fenol Equilibrado em Tris-HCl e aquecido a 60°C. Manter a incubação e a agitação durante 15 minutos.
5. Adicionar 10 ml de Tris/Acetato e 15 ml de Clorofórmio:Icool Isoamílico (24:1). Agitar vigorosamente durante 15 minutos, mantendo-se a 60°C.

6. Resfriar em banho de gelo e centrifugar durante 15 minutos a 2500 rpm a 4°C.

7. Recolher a fase aquosa, superior, procurando não arrastar interfase, muito grossa

8. Extrair duas vezes com Clorofórmio:Icool Isoamílico (24:1).

9. Transferir a fase aquosa para tubo corex e adicionar 1/4 volume de LiCl 10 M recém preparado.

10. Precipitar o RNA, incubando durante a noite a 4°C.

11. Centrifugar a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

12. Descartar o sobrenadante e secar a vácuo.

13. Ressuspender o sedimento em 15 ml de LiCl 2,5 M gelado. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

14. Lavar o sedimento com etanol 70% gelado (-20°C). Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Repetir a etapa anterior.

15. Descartar o sobrenadante e secar o sedimento a vácuo

16. Ressuspender o sedimento em 1 ml de água DEPC.

17. Determinar a concentração de RNA total medindo-se a absorbância a 260 nm de acordo com a fórmula descrita no item 3.13.1., considerando que 40 ug de RNA/ml = 1 unidade de densidade óptica.

18. Conservar a -70°C.

Soluções:

Tampão de Extração (RNA):

Tris-HCl 50 mM pH 7,6

EDTA 10 mM

Isotiocianato de Guanidina 47%

Lauril Sarcosinato de Sódio 2%

Fenol Equilibrado:

Bidestilar o fenol a 160°C para remover contaminantes que causam quebras do RNA e DNA. O fenol bidestilado deve ser estocado a -20°C em pequenas alíquotas. Para equilibrar o fenol de-se extrair várias vezes com igual volume de tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0 e extrair duas vezes com tampão Tris-HCl pH 8,0 e 0,2% de beta-mercaptoetanol, até que o pH da fase aquosa seja superior a 7,6.

Tris/Acetato:

Tris-HCl 10mM pH 7,4

Acetato de Sódio 0,1 M pH 5,2

EDTA 1 mM

3.13.2.2 - Isolamento de mRNA poli(A)⁺

A purificação de mRNA poli(A)⁺ partir de RNA total seguiu o método descrito por Fourney et al. (1988).

Procedimento:

1. Precipitar o RNA total em 0,1 volume de Acetato de Sódio 3M e 2,5 volumes de etanol gelado.

2. Incubar durante 2 horas a -20°C .

3. Centrifugar a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C .

4. Lavar o sedimento com etanol 70% gelado.

5. Centrifugar a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C .

6. Ressuspender o sedimento em 30 μl de água estéril e 30 μl de NaCl 0,5M.

7. Filtrar a solução de RNA total em Hybond-mAP. Para a filtragem do RNA total através da membrana Hybond-mAP, retângulos de papel Whatman 3MM (4 x 5 cm) são empilhados o suficiente para atingir 1 cm de altura. A membrana, previamente embebida em solução de NaCl 0,25 M, é colocada sobre a pilha de papel Whatman 3MM e a solução de RNA total é gotejada sobre a membrana, assim a solução é absorvida pelo papel Whatman 3MM e o mRNA poli(A)⁺ fica aderido à membrana.

8. Transferir a membrana Hybond-mAP para um tubo de ensaio contendo 6 ml de NaCl 0,5 M.

9. Lavar a membrana através de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação lenta.

10. Trocar a solução de NaCl e repetir a lavagem por duas vezes.

11. Transferir a membrana para outro tubo de ensaio contendo 6 ml de etanol 70% e incubar por 2 minutos sob agitação lenta, para remoção de sais.

12. Secar a membrana a temperatura ambiente e transferi-la para um tubo eppendorf.

13. Eluir o mRNA poli(A)⁺ adicionando-se 600 ul de água DEPC e incubando-se durante 5 minutos a 70°C.

14. Determinar a concentração e o grau de purificação do mRNA poli(A)⁺. O grau de purificação do mRNA poli(A)⁺ foi obtido comparando-se com a quantidade de RNA total extraída, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Purificação} = [\text{mRNA poli(A)}^+] / \text{RNA total (\%)}$$

3.13.3 - Purificação de DNA plasmidial

A técnica para isolar o DNA plasmidial em *E. coli* consiste em três etapas básicas:

- 1 - Crescimento da bactéria e amplificação do plasmídeo.
- 2 - Sedimentação e lise da bactéria.
- 3 - Purificação do DNA plasmidial.

Devido a diferença de replicação existente entre o DNA genômico da *E. coli* e o DNA plasmidial, este pode ser amplificado seletivamente adicionando-se ao meio de cultivo um agente inibidor da síntese de proteínas como cloranfenicol. Desta maneira se obtém rendimentos de 10 a 20 vezes superiores aos cultivos sem amplificação (Bolivar et al., 1977 e Norrander et al., 1983).

Os diferentes métodos de purificação de DNA plasmidial baseiam-se fundamentalmente na grande diferença do tamanho entre o DNA do cromossomo

de *E. coli* e o do plasmídio que usualmente é empregado como vetor. A grande diferença de tamanho existente entre o DNA plasmidial e o DNA genômico

permite que durante a lise celular, o DNA plasmidial conserve sua estrutura circular ligada covalentemente, enquanto que o DNA genômico se fragmenta na forma de longas cadeias lineares. A exposição a condições desnaturantes, como o calor ou o meio alcalino (até pH 12.5), produz a ruptura da maior parte das pontes de hidrogênio do DNA, desnaturando totalmente a molécula. Nessas mesmas condições as moléculas circulares de DNA plasmidial mantêm sua configuração nativa.

A técnica de purificação de DNA plasmidial em grande escala permite obter quantidades elevadas (0,5 a 5 mg de DNA por litro de cultivo bacteriano) e com alto grau de pureza. A purificação final baseia-se na diferença de comportamento do DNA plasmidial e do DNA genômico de *E. coli*, quando se ultracentrifuga em gradiente de cloreto de céσιο na presença de quantidades saturantes de agente intercalante como o brometo de etídio. O DNA linear e o circular com cadeia aberta ("nicked dsDNA") são capazes de reter mais agente intercalante, reduzindo mais sua densidade do que o DNA circular fechado covalentemente, bandeando em diferentes posições do gradiente.

O procedimento que se descreve está baseado na lise alcalina de Birnboim & Doly (1979) conforme o protocolo de Maniatis et al. (1982) modificado.

Procedimento:

a. Crescimento das bactérias:

01. Inocular um erlenmeyer de 50 ml contendo 10 ml de meio LB, acrescido de antibiótico apropriado, com uma colônia isolada a partir de um estoque glicerinado. A utilização de um antibiótico ou outro depende do plasmídio em questão. No caso do plasmídio pBR322 pode ser adicionado ampicilina ou tetraciclina (concentração de 35 a 50 ug/ml)

02. Incubar durante a noite a 37°C sob agitação vigorosa.

03. Inocular um erlenmeyer de 200 ml contendo 25 ml de meio LB, acrescido de antibiótico apropriado, com 0,1 ml de pré-inóculo.

04. Incubar a 37°C sob agitação vigorosa até uma D.O.₆₀₀ de aproximadamente 0,6

05. Inocular um erlenmeyer de 2 litros contendo 500 ml de meio LB com os 25 ml de inóculo.

06. Incubar a 37°C sob agitação vigorosa até uma D.O.₆₀₀ de 0,6 a 0,8.

07. Adicionar 2,5 ml de cloranfenicol 34 mg/ml em etanol.

08. Incubar por 16 horas a 37°C sob agitação vigorosa.

b. Sedimentação e lise das bactérias:

09. Deixar 10 a 20 minutos no gelo (4°C).

10. Sedimentar as bactérias por centrifugação a 7000 rpm (rotor JA-14 Beckman J2-21) por 10 minutos a 4°C. Eliminar o sobrenadante. Esse deve ser esterilizado em autoclave durante 20 a 30 minutos antes de descartá-lo.

11. Lavar o sedimento com 100 ml de solução STE gelada.

12. Ressuspender o sedimento bacteriano em 5 ml de Solução - I com auxílio da pipeta automática de 1000 µl.

13. Transferir para 2 tubos do rotor J-A20 e adicionar 2,5 ml da Solução - I acrescida de 10 mg/ml de lisozima.

14. Deixar à temperatura ambiente por 5 minutos.

c. Purificação:

15. Adicionar, para cada tubo, 10 ml de Solução II preparada recentemente e agitar lentamente por inversão várias vezes. A solução adquire uma densidade elevada.

16. Incubar em banho de gelo por exatamente 10 minutos.

17. Precipitar as proteínas e DNA genômico neutralizando a solução com 7,5 ml de Acetato de Potássio 5M pH 4,8 gelado. Agitar por inversão várias vezes.

18. Incubar em banho de gelo por exatamente 10 minutos.

19. Centrifugar a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sedimento deve conter restos celulares e DNA da bactéria.

20. Transferir o sobrenadante para outros 2 tubos de polipropileno e adicionar RNase (10 mg/ml) suficiente para obter 20 ug/ml.

21. Incubar durante 1 hora a 37°C.

22. Extrair 2 vezes em fenol saturado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e 1 vez em clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

23. Centrifugar a 12000 rpm durante 30 minutos.

24. Transferir o sobrenadante para tubos Corex e adicionar 0,6 volume de isopropanol.

25. Agitar e deixar à temperatura ambiente por 15 minutos.

26. Centrifugar a 12000 rpm por 30 minutos. Convém não realizar a centrifugação da precipitação com isopropanol a uma temperatura inferior a 20°C, pois os sais podem precipitar devido a sua elevada concentração.

27. Desprezar o sobrenadante e lavar o sedimento com 15 ml de etanol 70%. Secar em liofilizador.

28. Centrifugar a 12000 rpm durante 30 minutos.
29. Ressuspender o sedimento em aproximadamente 3 ml TE pH 8,0.
30. Transferir a solução para tubo de ensaio graduado e adicionar 1 g de CsCl para cada ml. Misturar lentamente por inversão.
31. Adicionar 0,8 ml de Brometo de Etídio (10 mg/ml) para cada 10 ml de solução. Misturar bem e ajustar a densidade da solução para 1,55 g/ml ($n = 1.3860$).
32. Transferir a amostra para tubo de ultracentrífuga de 5 ml.
33. Ultracentrifugar a 60000 rpm durante 20 horas a 20°C utilizando um rotor vertical Beckmann VTi80.
34. Coletar com auxílio de agulha de grosso calibre (15 x 12) e seringa de 1 ml a banda de DNA plasmidial, inferior, tomando o cuidado para não arrastar a superior (DNA linear e dsDNA "nicked") e transferir para tubo Eppendorf. O brometo de etídio produz rupturas nas cadeias de DNA ("nicks") na presença de luz. É conveniente proteger as soluções contendo DNA mais brometo de etídio com papel alumínio.
35. Eliminar o brometo de etídio por sucessivas extrações com 1-butanol saturado em água. Realizar extrações até que não mais apareça coloração rósea na fase alcoólica (superior). É importante eliminar o brometo de etídio imediatamente após a retirada das bandas de DNA do gradiente. Sabe-se que conservar a frio (4°C), inclusive protegido da luz, dificulta consideravelmente a extração do brometo de etídio, sendo impossível eliminá-lo completamente.
36. Dialisar a fase aquosa contra TE pH 8,0 durante 48 horas. Trocar o TE pH 8,0 uma vez

37. Determinar a concentração da preparação medindo-se a absorvância a 260 nm pela equação abaixo:

$$C = dA \times d \times 50 \text{ ug de DNA plasmidial.ml}^{-1}.$$

dA = variação da absorvância a 260 nm

d = fator de diluição

$50 \text{ ug de DNA.ml}^{-1} = 1$ unidade de densidade óptica

38. Conservar a -20°C .

Soluções:

Acetato de Potássio 5 M pH 4,8

Solução - I:

Glicose 50 mM

Tris-HCl 25 mM, pH 8,0

EDTA 10 mM

Autoclavar durante 15 minutos e adicionar 5 mg de lisozima/ml antes do

uso

Solução - II:

NaOH 0,2 N

SDS 1%

Prepara-se antes do uso a partir de soluções estoques de NaOH 2 N e de SDS 10%. Manter a temperatura ambiente pois o SDS precipita em baixas temperaturas.

TE pH 8,0:

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

3.14 - Digestão de DNA com enzimas de restrição.

Muitos microrganismos sintetizam um conjunto de enzimas denominadas endonucleases de restrição, cuja função é proteger o organismo degradando o DNA estranho. Cada enzima reconhece uma sequência de dupla cadeia de 4 a 6 nucleotídeos. A sequência correspondente ao genoma do microrganismo encontra-se modificada por metilação em adenina ou citosina diferenciando da sequência do organismo invasor. O descobrimento deste tipo de enzimas tem contribuído muito na manipulação das moléculas de DNA. Até 1986 cerca de 350 enzimas já haviam sido isoladas (Kessler & Holtke, 1986).

Existem três tipos de endonucleases de restrição. As denominadas do Tipo I e III apresentam juntas, na mesma molécula protéica, as atividades modificadora (metiltransferase) e restritiva (endonuclease). Estes dois tipos requerem para ATP como cofator e reconhecem sequências não metiladas no DNA. As enzimas do Tipo I cortam o DNA ao acaso e as do Tipo III o cortam em sítios específicos.

As enzimas do Tipo II são mais empregadas na manipulação de DNA. Trata-se de enzimas que reconhecem sítios específicos em DNA de dupla fita e apresentam unicamente atividade restritiva (endonuclease), estando a atividade modificadora (metiltransferase) correspondente, associada a outra

proteína. Apesar da diversidade da fonte de isolamento destas enzimas, as condições de reação são essencialmente as mesmas: DNA incubado a 37°C em solução tampão pH 7,5 contendo íons Mg^{2+} , frequentemente Na^+ , e enzima de restrição. Estas enzimas não precisam de ATP, porém, são dependentes de Mg^{2+} e reconhecem sequências palindrômicas de 4 a 6 pares de bases, cortando-as das cadeias de DNA na sequência ou perto dela.

As condições ótimas de digestão para as diferentes enzimas não são muito restritas. Devem considerar-se fundamentalmente duas variáveis: temperatura e composição do tampão de digestão. Os requerimentos quanto à temperatura são mais restritos do que a composição salina. Tem sido proposto um tampão de digestão adequado à maioria das enzimas de restrição. Porém, na prática empregam-se basicamente três tipos diferentes de tampões de digestão, denominados de baixa, média e alta força iônica. Existem enzimas, como Sma I e Xba I, que requerem um tampão especial para as condições ótimas da atividade máxima da enzima em questão.

As digestões são realizadas habitualmente em uma concentração de DNA de 0,1 ug/ml, empregando-se de 2 a 4 vezes a quantidade de enzima necessária. Entende-se por 1 unidade de enzima de restrição, a quantidade de enzima necessária para digerir 1 ug de DNA de fago lambda cl857, em 1 hora e na temperatura ótima de digestão. As misturas são incubadas de 1,5 a 3 horas.

Procedimento:

1. Precipitar 15 ug de DNA em 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e etanol gelado.
2. Incubar durante a noite a -20°C.
3. Centrifugar a amostra a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

4. Lavar o sedimento duas vezes com etanol 70% gelado e liofilizar por 2 minutos.

5. Ressuspender o sedimento em 80 μ l de água destilada estéril.

6. Adicionar 10 μ l de tampão específico para cada enzima de restrição, 2,5 μ l de espermidina (0,1 M), 3 μ l de enzima de restrição e 4,5 μ l de água destilada estéril. Para cortar grandes quantidades de DNA com enzima de restrição são utilizados tampões de digestão específicos para cada enzima de restrição. No caso das enzimas Eco RI e Hind III foram utilizados os tampões indicados pela Amersham. Para a enzima Hind III foi utilizado o Tampão E4 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl 7 mM, 2BME 7 mM) e para a enzima Eco RI foi utilizado o Tampão E8 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 80 mM, MgCl 7 mM, 2BME 7 mM).

7. Homogeneizar gentilmente e centrifugar brevemente.

8. Incubar a 37°C durante a noite.

9. Interromper a reação pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M.

10. Precipitar o DNA digerido com 2,5 volumes de etanol.

11. Incubar a -20°C por 2 horas.

12. Centrifugar a 15000 rpm por 30 minutos a 4°C.

13. Lavar os sedimentos com etanol 70% gelado.

14. Centrifugar novamente a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C.

15. Ressuspender em 25 μ l de água destilada estéril.

16. Adicionar 4 μ l de glicerol 30% contendo 0,25% de azul de bromofenol.

3.15 - Eletroforese de DNA

As técnicas eletroforéticas são muito utilizadas na separação e identificação de fragmentos de DNA e RNA, assim como para seu isolamento a partir de misturas heterogêneas (eletroforeses preparativas).

As eletroforeses de DNA podem ser realizadas em suportes de agarose (Helling et al., 1974), acrilamida (Maniatis et al., 1975) ou em géis combinados agarose-acrilamida. A aplicação mais comum é a separação de fragmentos de DNA de dupla fita em pH neutro. Nestas condições, o DNA apresenta uma carga negativa e migra a partir do ânodo para o cátodo do sistema. A mobilidade eletroforética dos fragmentos de DNA é dependente do tamanho e pouco afetada pela composição das bases nitrogenadas ou suas sequências. Os fatores determinantes da mobilidade eletroforética são os seguintes: Tamanho e conformação do DNA, porosidade do gel ecorrente aplicada durante a eletroforese (Maniatis et al., 1982).

Para realização de eletroforese em gel de agarose diferentes tamanhos de géis horizontais são utilizados:

a. minigéis: 10,2 x 6,5 cm, com um volume de 30 ml.

b. géis medianos: 15 x 10,7 cm, com um volume de 100 ml.

c. géis grandes: 20 x 18,2 cm, com volume de 150 ml.

A escolha de um ou outro depende do experimento a ser realizado. Assim, para análise da qualidade, quantidade de DNA e comprovação da digestão, emprega-se minigéis. Os géis medianos e grandes são usados para eletroforeses preparativas e estudo de DNA genômico. A vantagem dos minigéis é uma economia, pois os volumes do gel e as amostras necessárias são menores, bem como o tempo para a eletroforese, que é de 1 hora.

Nos géis de agarose nativos o DNA corre em forma de dupla fita. Sua migração é afetada por fatores que foram descritos anteriormente. Paralelamente a amostra analisada, corre-se diferentes marcadores de peso molecular, na margem de tamanho em que se esperam os fragmentos testados.

Procedimento:

1. Pesar a quantidade correspondente de agarose (0,8%) e adicionar em volume correspondente de Tampão TBE.

2. Utilizando um forno de microondas, aquecer até dissolver a agarose, evitando que restem partículas livres.

3. Esperar esfriar até aproximadamente 50°C e adicionar 0,5 ug/ml brometo de etídio.

4. Verter a solução sobre placa de vidro, selando-se as extremidades com fita adesiva e deixar à temperatura ambiente por 30 minutos a 1 hora.

5. Colocar o gel em uma cuba de eletroforese e adicionar Tampão TBE.

6. Adicionar às amostras 1/5 do volume de Tampão de Amostra 6x. Incubar durante 5 minutos em banho a 65°C e encher os pocinhos. No Tampão de Amostra pode-se empregar glicerol ou ficoll. Em minigéis devem ser aplicados, normalmente, cerca de 100ng de DNA por banda. Bandas de até 10 ng podem ser detectadas. As amostras que contêm fragmentos de restrição de DNA são aquecidas antes de carregá-las no gel, para evitar que os extremos coesivos (cos) que estão unidos mantenham os fragmentos unidos durante a eletroforese, fazendo aparecer bandas artificiais. Isto é especialmente importante no caso dos marcadores de peso molecular obtidos por restrição de DNA de fago lambda, devido a presença dos extremos cos.

7. Aplicar uma voltagem constante de 20 e 80 V e deixar correr até que o corante, azul de bromofenol, tenha atingido 2/3 partes do gel. A migração

correta do DNA pode ser seguida visualizando-se o gel em transiluminador quando for necessário ou mediante os corantes que contem o Tampão de Amostra.

8. Visualizar o gel através de um transiluminador de luz UV utilizando óculos que filtrem a luz UV, fotografá-lo com filme Panatomic-x ASA 32 (Kodak). No caso de querer-se visualizar bandas com pouco DNA, até 1 ng, é necessário eliminar o brometo de etídio do gel. Consegue-se isto, submergindo-o em Solução de MgSO₄ 1mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Quando se deseja comparar amostras com diferentes conteúdos de sais, é importante corrigir as diferenças, pois a quantidade de sais nas amostras influem na mobilidade do DNA.

Soluções:

Tampão de Amostra:

Azul de bromofenol 0,25%

Glicerol 30%

Tampão TBE:

Tris-borato 0,089 M

Ácido bórico 0,089 M

EDTA 0,002 M

3.16 - Eletroforese de mRNA poli(A)⁺. Gel de agarose-formaldeído

Os géis de RNA incluem agentes desnaturantes do tipo formaldeído, hidróxido de metilmercúrio ou uréia. A presença do agente desnaturante no gel ou na amostra impede que o RNA adote estruturas secundárias. Apenas nessas

condições a mobilidade do RNA é proporcional ao logaritmo de seu peso molecular. Além dessa característica, os géis são basicamente idênticos aos empregados para a análises de DNA. Os géis horizontais são preparados nas mesmas dimensões que os empregados para DNA. Normalmente emprega-se géis de agarose 1,5%. Todo material empregado no gel deve ser isento de RNAses.

Procedimento:

1. Adicionar 2,25 g de agarose NA, livre de RNase, a 15 ml de MOPS/EDTA 10x e 130 ml de água DEPC.

2. Aquecer em um forno microondas até que a agarose esteja completamente dissolvida. Esfriar até 65°C e incubar em banho Maria a 65°C.

3. Em uma capela, adicionar 7,65 ml de formaldeído 37%. O formaldeído dever ter um pH superior a 4,0 e ser adicionado, agitando-se lentamente.

4. Verter a solução sobre um suporte de gel selado com fita adesiva. Deixar gelificar por 30 minutos a 1 hora. A cuba de eletroforese, assim como o pente devem ser lavados com água contendo detergente e enxaguados abundantemente em água DEPC. É conveniente deixá-los incubando a 37°C durante a noite em água contendo 0,1% de dietilpirocarbonato, no dia seguinte enxaguados e secos.

5. Em uma cuba de eletroforese, adicionar MOPS/EDTA na cuba até o nível do gel. Lavar os pocinhos do gel com MOPS.

6. Pipetar em tubos Eppendorf o mRNA poli(A)⁺ (5-10 ug) e adicionar água DEPC até completar 5,0 ul por amostra.

7. Adicionar 25 ul de Tampão de Amostra.

8. Incubar a 65°C durante 15 minutos e colocar no gelo.

9. Adicionar 1 μ l de brometo de etídio 10mg/ml.

10. Carregar as amostras nos pocinhos e submeter o gel a uma diferença de potencial de 1 V/cm durante aproximadamente 18 horas.

11. Após a eletroforese, colocar o gel sobre um transiluminador com lâmpadas de ultra violeta (302 nm) para ser analisado e fotografado com filme Panatomic-x ASA 32 (Kodak). Habitualmente os rRNAs são empregados como marcadores de peso molecular, uma vez que os tamanhos de rRNAs vegetais são conhecidos (Dyers, 1979):

rRNA citoplasmático:

25 S $1,3 \times 10^6$ daltons 3580 nucleotídeos

18 S $0,7 \times 10^6$ daltons 1926 nucleotídeos

12. Recortar do gel a canaleta do padrão de peso molecular e transferí-la para uma pequena cuba de acrílico.

13. Para corar o padrão, todo formaldeído deve ser eliminado lavando-se o gel em água durante 4 horas e em seguida em acetato de amônio 0,1 M durante 1 hora.

14. Corar durante 1 hora com brometo de etídio/acetato de amônio.

15. Descorar durante a noite em acetato de amônio 0,1 M e 2BME 0,01 M. Registrar as distâncias de migração das bandas do padrão.

Soluções:

MOPS/EDTA 10x:

MOPS 0,2 M

Acetato de Sódio 50 mM

EDTA 10 mM

Ajustar o pH 7,0 com NaOH. Após a autoclavagem a solução adquire cor amarela.

Brometo de Etídio:

1 mg/ml em água DEPC

Tampão de Amostra:

Formamida deionizada 0,75 ml

MOPS 10 x 0,15 ml

Formaldeído 0,24 ml

Água DEPC 0,1 ml

Glicerol 0,1 ml

Azul de Bromofenol 10 mg/ml 0,08 ml

Brometo de Etídio/Acetato de Amônio:

Brometo de etídio 0,5 ug/ml

Acetato de amônio 0,1 M

2BME 0,01 M

3.17 - Purificação de inserto a partir de gel de agarose

Existe uma grande variedade de métodos para recuperação de DNA a partir de géis de agarose e acrilamida. Todos eles apresentam basicamente dois problemas. Em primeiro lugar, a maioria das agaroses é contaminada por polissacarídeos sulfatados que podem ser extraídos juntamente com o DNA e que são potentes inibidores de muitas das enzimas empregadas posteriormente, como endonucleases de restrição, metiltransferase, ligases, quinases, etc.. Em segundo lugar, a recuperação de fragmentos grandes de DNA costuma ser baixa, cerca de 20%, para fragmentos de 20 Kb ou superior.

O método do papel DEAE-celulose, descrito por Dretzen (1981); tem sido mais empregado. A simplicidade de manipulação das amostras e o elevado rendimento o torna muito adequado. O papel DEAE-celulose em condições de baixa força iônica apresenta uma elevada afinidade pelo DNA, e o DNA ligado pode ser recuperado lavando-se o papel com tampão de elevada força iônica. Tem-se empregado na purificação de DNA linear de tamanhos compreendidos ente 100 e 5000 bp. Para DNA superhelicoidal, DNA de cadeia simples ou DNA de dupla cadeia de grande tamanho, os rendimentos são pequenos.

Procedimento:

a. Preparação do papel DEAE-celulose:

Este tratamento se faz necessário para eliminar possíveis impurezas dos papéis que afetariam a eluição do DNA e os processos posteriores.

1. Submergir retângulos de papel DEAE-celulose (DE81) de 1 cm² durante 2 horas em uma solução de NaCl 2,5 M a 4°C. 2. Lavar 3 vezes com água destilada estéril e 1 vez com tampão TBE por 5 minutos.

b.Purificação de DNA:

3.Separar os fragmentos de DNA em um gel de agarose 1% contendo 0,5 ug/ml de brometo de etídio para visualizar-se as bandas com luz UV.

4.Colocando o gel sobre um transiluminador UV de onda longa (302 nm) visualizar os fragmentos. Com um bisturi fazer uma incisão perpendicular à banda a ser purificada.

5.Com auxílio de uma pinça, abrir a incisão e colocar o papel DEAE-celulose na mesma altura da banda. Pressionar o gel contra o papel para evitar a formação de bolhas.

6.Girar 90° o gel dentro da cuba e prosseguir a eletroforese 7.Comprovar se todo o DNA aderiu ao papel DEAE-celulose visualizando-o com luz UV.

8.Retirar o papel contendo o DNA e colocá-lo em um tubo

Eppendorf. Lavar em água estéril por 3 vezes.

9.Adicionar 200 ul de Tampão de Eluição e incubar durante 30 minutos a 37°C.

10.Recuperar o tampão, centrifugando por 15 segundos a 15000 rpm a temperatura ambiente.

11.Adicionar 100 ul de Tampão de Eluição. Incubar durante 15 minutos a 37°C.

12.Recuperar o tampão centrifugando por 15 segundos a 15000 rpm a temperatura ambiente.

13.Repetir as etapas 11 e 12.

14. Adicionar 400 μ l de 1-butanol saturado em Tampão de Eluição, agitar com Vortex e centrifugar por 1 minuto a 15000 rpm a temperatura ambiente.

15. Eliminar a fase superior alcoólica.

16. Fazer extrações com fenol saturado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

17. Adicionar 2 volumes de etanol gelado e incubar a -20°C durante a noite.

18. Centrifugar a 15000 rpm por 30 minutos a 4°C .

19. Lavar o sedimento com etanol 70% gelado.

20. Liofilizar por 2 minutos.

21. Ressuspender em 19 μ l de água destilada estéril. A recuperação dos fragmentos lineares oscilam entre 60 a 90%, dependendo do tamanho do DNA. A recuperação de DNA helicoidal, de cadeia simples ou maior que 10 Kb é de 20% ou menos. Os fragmentos purificados por este método são utilizados em reações de restrição, ligação e marcação sem que se observe algum tipo de inibição da reação.

Soluções:

Tampão de Eluição:

Tris-HCl 20 mM pH8,0

EDTA 2 mM

NaCl 1,5 M

1-butanol saturado em Tampão de Eluição:

Misturar 4 volumes de 1-butanol com 1 volume de Tampão de Eluição. Agitar com vortex e deixar separar as fases durante 1 a 2 horas.

3.18 - Transferência de DNA e mRNA para filtros de nylon

A localização de fragmentos de DNA ou de RNA com homologia a fragmentos empregados como sondas, por hibridização, é uma técnica fundamental em biologia molecular. Tem-se empregado normalmente a técnica de transferência descrita por Southern (1975). O método consiste, basicamente, em separar o DNA em um gel, em colônias bacterianas ou placas de lise, desnaturá-lo e fixá-lo sobre um filtro de nitrocelulose ou nylon. Normalmente emprega-se filtros de nitrocelulose, exceto para trabalhos com DNA genômico, são utilizados filtros de nylon (Zeta-ProbeTM BioRad, HybondTM Amersham).

Após a transferência, o DNA aderido ao filtro é hibridizado com DNA marcado com ³²P e as sequências complementares são localizadas por autoradiografia.

Esta técnica é empregada para localizar sequências específicas de DNA clonado, assim como DNA genômico digerido com diferentes enzimas de restrição.

3.18.1 - Transferência de fragmentos de restrição de DNA

A técnica de transferência lenta assegura uma elevada eficiência do processo.

Procedimento:

1. Separar o DNA por eletroforese em gel de agarose. Fotografar o gel colocando uma régua milimetrada na lateral com finalidade de obter uma referência do tamanho real do gel.

2. Transferir o gel para uma cuba de vidro e submetê-lo ao processo de depuração em HCl.

3. Incubar o gel em Solução de Depuração por 15 minutos a temperatura ambiente. A depuração com HCl tem um efeito de ruptura das cadeias de DNA facilitando a transferência.

4. Lavar em água destilada estéril para a retirada do excesso de HCl.

5. Desnaturação. Incubar por 30 minutos em Solução de Desnaturação a temperatura ambiente. Trocar a solução a cada 15 minutos.

6. Lavar com água destilada estéril.

7. Neutralizar. Incubar por 1 hora em Solução de Neutralização a temperatura ambiente sob leve agitação.

8. Transferir o gel para uma Solução SSC 10x.

9. Montar o sistema descrito na Figura - 4.

3 retângulos de papel Whatman 3MM do tamanho do gel embebidos em SSC 10x.

- 1 retângulo de papel Whatman 3MM do tamanho do gel.

- 1 tira de papel Whatman com a largura do gel e comprimento suficiente para interligar os dois reservatórios da cuba de eletroforese utilizada para a transferência.

- vários retângulos de papel absorvente com altura aproximadamente de 5 cm de papel absorvente.

- filtro de nylon Hybond N (Amersham).

- 1 placa de vidro 20 x 20 cm.

- 1 peso de 0,5 a 1 Kg. Pode ser utilizado 1 erlenmeyer de 1 litro contendo aproximadamente 800 ml de água.

10. O Tampão de Transferência a ser utilizado é SSC 10x. Envolver todo o sistema com capa de plástico para evitar evaporação.

11. Deixar transferindo durante 8 a 12 horas.

12. Desmontar o sistema, marcar os pocinhos e fazer um corte no filtro para orientá-lo.

13. Lavar rapidamente com solução SSC 2x para remover alguma agarose que possa encontrar-se aderida ao filtro.

14. Secar o filtro a temperatura ambiente.

15. Envelopar em papel Whatman 3MM.

16. Incubar a 80°C durante 2 a 3 horas para fixar o DNA. Após a fixação do DNA ao filtro este pode ser conservado por longo período de tempo a 4°C no escuro.

Soluções:

Solução de Depurinação:

HCl 0,25 M

Solução de Desnaturação:

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

Solução de Neutralização:

Tris-HCl 1 M pH 8,0

NaCl 1,5 M

SSC 10x pH 7,4:

NaCl 1,5 M

Citrato trissódico.H₂O 0,15 M

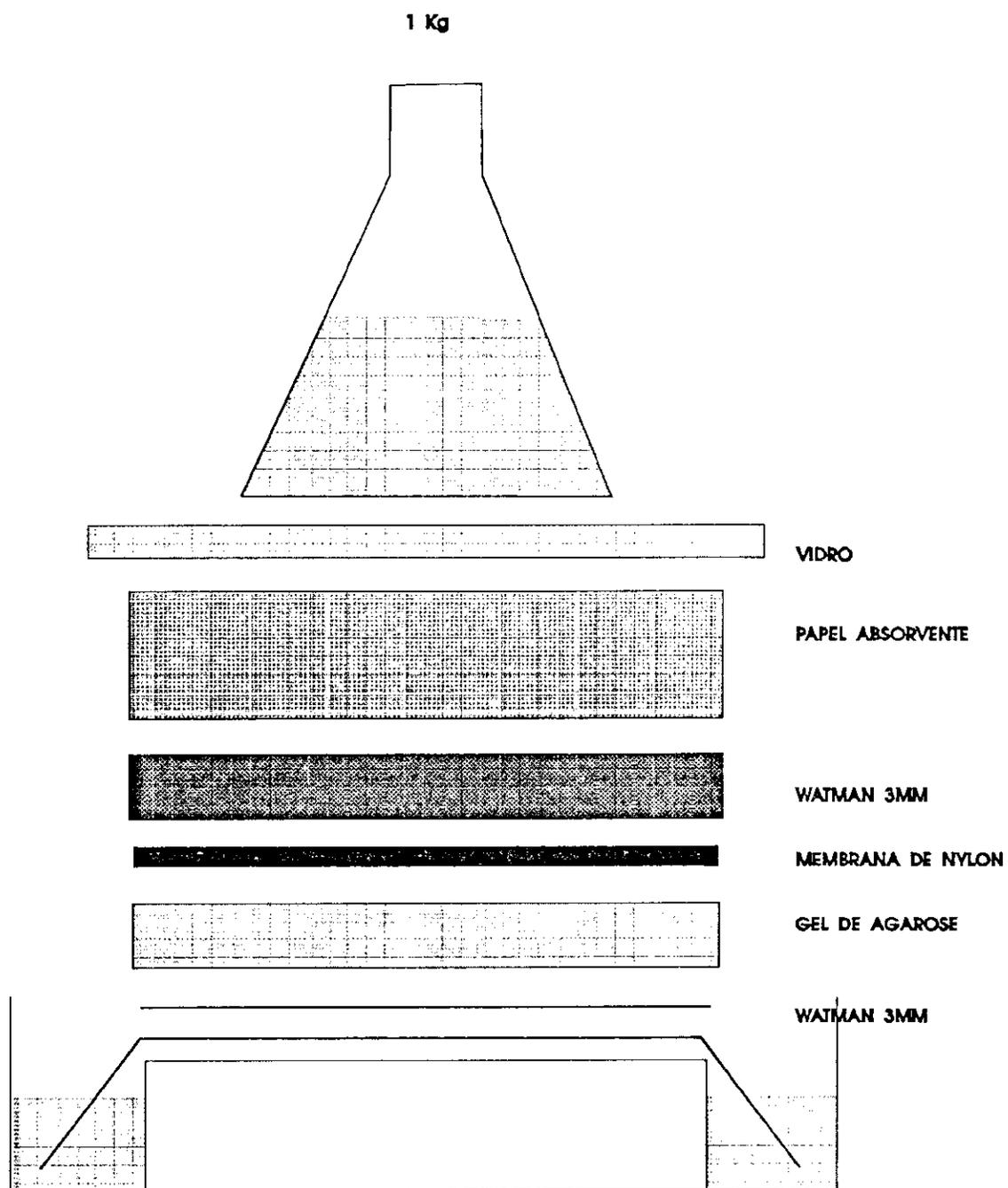


Figura - 4 Transferência de DNA ou RNA para membrana de nylon.

3.18.2 - Transferência de mRNAs poli(A)⁺ para membrana "Hybond-mAP".

A transferência se faz a partir de géis de agarose-formaldeído, desnaturantes, para permitir a correta medida do peso molecular. Todo o material deve estar livre de RNase.

Procedimento:

1. Separar os RNAs em um gel de agarose-formaldeído.
2. Lavar o gel com água DEPC duas vezes por 5 minutos.
3. Incubar em uma solução de NaOH 50 mM por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Incubar em uma solução de SSC 1x por mais 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Incubar em uma solução SSC 10x por 30 minutos a temperatura ambiente. Trocar a solução a cada 15 minutos.
6. Montar o sistema descrito na Figura - 4.
 - 3 retângulos de papel Whatman do tamanho do gel embebidos em SSC 10x.
 - 1 retângulo de papel Whatman do tamanho do gel.
 - 1 tira de papel Whatman com largura do gel e comprimento suficiente para interligar os dois reservatórios da cuba de eletroforese utilizada para a transferência.

- vários retângulos de papel absorvente com altura aproximadamente de 5 cm de papel absorvente.

- filtro de nylon Hybond N (Amersham).

- 1 placa de vidro 20 x 20 cm

- 1 peso de 0,5 a 1 Kg. Pode ser utilizado 1 erlenmeyer de 1 litro contendo aproximadamente 800 ml de água.

7.O Tampão de Transferência a ser utilizado é SSC 10x. Envolver todo o sistema com capa de plástico para evitar evaporação.

8.Deixar transferindo durante 8 a 12 horas.

9.Desmontar o sistema, marcar os pocinhos e fazer um corte no filtro para orientá-lo.

10.Lavar com uma solução SSC 2x para remover alguma agarose que possa encontrar-se aderida ao filtro.

11.Secar o filtro a temperatura ambiente.

12.Envelopar em papel Whatman 3MM.

13.Incubar a 80°C durante 2 a 3 horas para fixar o mRNA poli(A)⁺. Após a fixação do RNA ao filtro, este pode ser conservado por longo período de tempo a 4°C no escuro.

Soluções:

SSC 10x pH 7,4:

NaCl 1,5 M

Citrato trissódico.2H₂O 0,15 M

3.19 - Marcação Radioativa do DNA. "Random-primer".

O desenvolvimento das técnicas de marcação dos ácidos nucleicos tem sido considerado de grande importância na investigação do DNA recombinante. Ao longo da última década tem sido desenvolvida uma série de técnicas para incorporar de marção radioativa aos ácidos nucleicos com elevada eficiência. Neste trabalho foram utilizadas sondas de DNA marcadas radioativamente para:

- "Southern Blotting": detecção de DNA fragmentado em gel e transferido para membrana de nylon.

- "Northern Blotting": detecção de mRNA poli(A)⁺ em gel e transferido para membrana de nylon.

3.19.1 - "Random-primer".

Na técnica de "Random Primer", sequências variadas de hexanucleotídeos produzidos, seja por digestão com DNase I de DNA de timo de bezerro ou por síntese de oligonucleotídeos, têm sido empregados como "primers" para preparar cópias marcadas tanto de DNA como RNA. Com esta técnica obtém-se DNA marcado com uma elevada atividade específica de $1,8 \times 10^9$ cpm ³²P/ug de DNA empregando um só nucleotídeo marcado. Quando são utilizados três nucleotídeos marcados consegue-se apenas um pequeno aumento na atividade específica (3×10^9 cpm ³²P/ug de DNA).

A quantidade de DNA empregado como molde em uma reação é de 10 a 25 ng. A incorporação de radioatividade é da ordem de 70 a 80% em reações de 3 a 4 horas a temperatura ambiente. Consiste em uma técnica ideal para situações como a localização de genes de cópia única em "blots" genômicos,

onde requer-se sondas de elevada atividade específica e baixa concentração. O tamanho dos fragmentos marcados oscila entre 100 a 200 nucleotídeos.

Neste trabalho seguiu-se o procedimento descrito no manual do Kit "Multiprime DNA Labelling System" da Amersham (RPN1600Z). A composição das soluções são indicadas qualitativamente. Como nucleotídeo marcado emprega-se habitualmente [alfa³²P]dCTP com atividade específica de 3000 Ci/nmol (Amersham PB10204).

Procedimento:

1. Preparar uma solução de inserto a ser marcado em uma concentração de 25 ug/ml em água ou Tampão TE.

2. Transferir para um tubo Eppendorf:

-2,5 ul da Solução de plasmídeo (25 ug/ml).

-20,5 ul de água estéril.

3. Incubar durante 2 minutos a 100°C e em seguida colocar no gelo.

4. Adicionar

4 ul de solução dTTP (100 uM),

4 ul de solução dGTP (100 uM),

4 ul de solução dATP (100 uM),

5 ul de Tampão de Reação e

5 ul de Solução "Primer".

5. Centrifugar brevemente.

6. Adicionar de 30 a 50 uCi de [alfa³²P]dCTP.

7. Adicionar 2 ul de Klenow DNA polimerase (5 U/ul). Agitar lentamente, pois a enzima pode perder a atividade.

8. Incubar durante 1 a 2 horas em banho Maria a 37°C. A temperatura e o tempo de reação podem ser escolhidos convenientemente, pois a reação atinge um máximo de incorporação rapidamente e não reduz, significativamente durante até mesmo 24 horas.

9. A partir de 1 hora de reação, quantificar a incorporação da radioatividade até aproximadamente 80% e interromper a reação pela adição de 4 ul de EDTA 0,5 M pH 8,0. A partir de 1 hora de reação, a taxa de incorporação deve ser quantificada até atingir cerca de 80%.

10. Purificar a sonda marcada através de filtração em coluna de Sephadex G-50 equilibrada com Tampão STE.

11. Quantificar a radioatividade e determinar o rendimento da marcação. O rendimento da reação de marcação é determinado, comparando-se a radioatividade da solução antes e após a filtração da sonda marcada através da coluna de Sephadex G-50.

Soluções:

Tampão de Reação:

Tris-HCl 250 mM pH 8,0

MgCl₂ 25 mM

2BME 0,4%

HEPES 600 mM pH 6,6

NaOH 1,2 M

Solução "Primer":

Hexanucleotídeos de sequências variadas em uma solução aquosa com BSA livre de nucleases.

Tampão STE:

Tris-SCI 10 mM pH 8,0

EDTA 1 mM

NaCl 100 mM

3.19.2 - Quantificação da incorporação de radioatividade

Procedimento:

1. Pipetar 1 ul de solução radioativa em papel Whatman DEAE (1cm²).
2. Secar a temperatura ambiente.
3. Medir a radioatividade utilizando cintilador.
4. Lavar o papel com Fosfato Dissódico 0,5 M 3 vezes durante 2 minutos.
5. Lavar em água destilada estéril 3 vezes durante 2 minutos.
6. Lavar em etanol 3 vezes durante 2 minutos.
7. Secar rapidamente com auxílio de uma lâmpada incandescente de 500 W.
8. Medir a radioatividade remanescente.

3.20 - Hibridização de sondas de DNA sobre filtros de DNA.

A taxa de hibridização para sondas de cadeia simples sobre DNA fixado a membranas, segue uma cinética de primeira ordem, onde a sonda complementar encontra-se em excesso em relação a dupla fita formada.

Existe uma relação entre a taxa de hibridização e o tamanho da sonda, de sua complexidade molecular (número total de pares de bases em uma sequência não repetida), da temperatura de hibridização, da força iônica do meio, da viscosidade e do pH. A força iônica e o pH pouco afetam esta relação. Sabe-se que, por determinação empírica, a taxa máxima de hibridização em uma solução ocorre aproximadamente a 25°C, pouco abaixo da temperatura de dissociação (T_m) do duplex. A T_m de uma molécula de DNA é aquela na qual a metade dos duplex encontram-se dissociados (Britten & Kohne, 1966). Isto é verificado para sondas de tamanho superior a 150 bp (Cox et al., 1983). Esta temperatura ótima com máxima taxa de reassociação é muito mais baixa para sondas curtas, menores que 100 bp (Brahic & Haase, 1978).

A taxa de hibridização pode aumentar em soluções e em hibridizações sobre DNA fixado à membrana empregando-se polímeros de dextrano amoníacos, como por exemplo sulfato de dextrano 500. Em hibridizações sobre membrana o efeito do sulfato de dextrano é mais acentuado para polinucleotídeos de tamanho superior a 250 bp e não tem efeito apreciável sobre oligonucleotídeos de 14 bp (Maniatis, 1982). O incremento da taxa de hibridização é cerca de 3 vezes para hibridizações sobre membrana quando se usam sondas de DNA de cadeia simples e da ordem de 100 vezes quando se trata de sondas de DNA de dupla fita.

Dado que, a concentração da sonda é um fator decisivo na taxa de hibridização, é recomendável empregar volumes pequenos, por exemplo

hibridizando em bolsas de plástico seladas. Isto reduz a quantidade de sonda necessária e conseqüentemente a periculosidade de sua manipulação.

A formação de híbridos é um processo reversível que depende de vários fatores, por isso é importante ajustar as condições de hibridização em torno do ponto ótimo, a fim de que haja discriminação entre híbridos perfeitos e imperfeitos. A estabilidade do duplex pode ser determinada através da T_m que depende da força iônica do meio de hibridização, basicamente da concentração de Na^+ dada em mol/l. Sabendo-se a composição de bases dada pela % de Guanina + Citosina, o comprimento do duplex (n), a concentração de elementos desestabilizadores da hélice, como a formamida, e que a solução de SSC contém $0,195 \text{ M Na}^+$, (Maniatis, 1982) existe estabelecido a seguinte expressão para quantificar a influência destes fatores para sondas maiores de 50 bp:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6\log M + 0,4(\%G + C) - 500/n - 0,7(\%\text{formamida})$$

Para híbridos de tamanho superior a 150 bp a T_m do DNA duplex decresce em 1°C por cada 1% de pares de bases dissociadas (Bonner et al., 1973).

O uso de formamida na solução de hibridização reduz a T_m em $0,7^\circ\text{C}$ a cada 1% de formamida. Isto permite reduzir a temperatura de hibridização para evitar os problemas causados pela evaporação em sistemas não selados, aumentando a taxa de hibridização cerca de 2 a 3 vezes.

Desta forma, a severidade da hibridização ("stringency") deve ser ajustada fixando-se a concentração de sal e/ou a de formamida e variando a temperatura. A estringência pode ser ajustada tanto durante a hibridização quanto na lavagem. Em algumas aplicações é conveniente fazer a hibridização com pouca estringência e aumentando-a durante a lavagem. Desta forma é possível a detecção de seqüências relacionadas e também seguir a eficácia de cada lavagem na eliminação destas seqüências.

Procedimento:

a. Pré-hibridização:

1. Colocar o filtro em um saco de polietileno e selar três lados de modo que estejam ajustados ao filtro.

2. Adicionar Solução de Pré-hibridização. O volume de hibridização deve ser o menor possível para aumentar ao máximo a concentração da sonda. Normalmente emprega-se o volume de 0,08 ml de solução de hibridização para cada cm^2 do filtro quando se pré-hibridiza e 0,05 ml/ cm^2 quando se hibridiza.

3. Retirar as bolhas e selar completamente.

4. Incubar durante 10 a 12 horas a 42°C , ou a temperatura correspondente ao T_m da sonda utilizada, sob leve agitação.

b. Hibridização:

5. Cortar um dos cantos do saco de polietileno e drenar o máximo possível a Solução de Pré-hibridização. É importante não permitir que o filtro seque, o que acarretaria aumento no "back-ground" radioativo do filtro.

6. Adicionar nova Solução de Pré-hibridização (0,05 ml/ cm^2).

7. Retirar as bolhas.

8. Desnaturar a sonda de DNA em banho Maria fervente durante 5 minutos e colocar no gelo. Probes de fita única como RNAs e M13, não necessitam de desnaturação. Usualmente utiliza-se sondas de atividade específica entre 10^6 a 10^8 cpm/ μg .

9. Adicionar a sonda e selar novamente.

10. Incubar durante a noite a 42°C, ou a temperatura correspondente ao T_m da sonda utilizada, sob leve agitação.

c. Lavagem:

11. Cortar um dos cantos do saco de polietileno e descartar a solução de hibridização.

12. Retirar o filtro e incubar durante 15 minutos em 200 ml de Solução SSC 2x contendo 0,1 % de SDS a temperatura ambiente, sob leve agitação.

13. Repetir a lavagem anterior.

14. Para maior estringência, incubar durante 1 hora a 60°C em Solução SSC 0,1x acrescida de 0,1% de SDS, sob leve agitação.

15. Lavar o filtro brevemente em Solução SSC 2x.

16. Embrulhar e selar em filme de PVC. No caso de utilização do filtro para re-hibridização, o filtro deve ser guardado embrulhado em filme de PVC e selado. Quando não há necessidade de reutilização do filtro, este deve ser seco e exposto a filme de Raio X resultando em maior intensificação da marcação.

17. Expor o filtro a filme de Raio X (Kodak X-O mat RP) em cassete radiográfico munido de intensificador. Colocar a -70°C. A exposição a -70°C, na presença de intensificadores aumenta cerca de 8 a 10 vezes a sensibilidade do filme devido ao prolongamento da reflexão da fluorescência.

Soluções:

Solução de Pré-hibridização:

Solução de SSC 6x

Sulfato de Dextran 2,5%

Molico 0,5%

SDS 0,2%

DNA de Esperma de Salmão 250 ug/ml

Filtrar a solução em papel Whatman 3MM

SSC 10x pH 7,4:

NaCl 1,5 M

Citrato trissódico.2H₂O 0,15 M

Solução de DNA de Esperma de Salmão:

1. Dissolver 10 mg de DNA de esperma de salmão/ml de água.
2. Agitar durante 2-4 horas utilizando agitador magnético .
3. Fragmentar o DNA submetendo-o a diversas passagens através de agulhas 19, 23 e 25.
4. Adicionar RNase 20 ug/ml durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Adicionar pronase ou proteinase K 50 ug/ml durante 3 horas a 37°C.

6.Extrair com fenol, fenol saturado com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

7.Adicionar 0,1 volume de Acetato de Sódio 3 M.

8.Precipitar o DNA com adição de 2 volumes de etanol.

9.Lavar o sedimento com etanol 70%.

10.Ressuspender em TE.

11.Dialisar contra TE.

12.Medir a concentração.

3.21 - Hibridização de sondas de DNA sobre filtro de RNA

Procedimento:

O procedimento para hibridização de DNA sobre filtro de RNA é o mesmo descrito para filtro de DNA.

3.22 - Densitometria

A quantificação de mRNA poli(A)⁺ pode ser determinada através das intensidades das bandas no filme de Raio X. Neste procedimento utilizou-se um densitômetro Ultrosan XL (Enhancer Laser Densitometer - LKB).

4 - RESULTADOS

4.1 - Determinação do padrão eletroforético da enzima ADH.

O padrão eletroforético da ADH foi determinado através de eletroforese em gel de amido 12%. As linhagens homozigóticas apresentam isoenzimas do tipo rápida FF (Figura - 5, canaleta 1) ou do tipo lenta SS (Figura - 5, canaleta 3). Padrões apresentando as duas formas isoenzimáticas (FF e SS) e uma terceira forma híbrida (FS) podem ser encontrados em materiais heterozigotos (Figura - 5, canaleta 2). A banda híbrida, intermediária, provém da formação de dímeros do tipo FS. Essas isoenzimas constituem formas intragênicas. Quando linhagens homozigóticas de milho do banco de germoplasma do Departamento de Genética e Evolução - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (Tabela - 3) foram caracterizadas, quanto ao padrão eletroforético dos isoalelos da ADH, a existência dos dois isoalelos, típicos da ADH, puderam ser observados entre as linhagens. Um deles, do tipo Adh1-F, formando dímeros do tipo FF próximos do eletrodo positivo e outro, do tipo Adh1-S, formando dímeros SS próximos do eletrodo negativo. A maioria das linhagens analisadas apresentaram o padrão tipo FF. Somente a linhagem CDwxwx apresentou isoenzimas do tipo Adh1-SS. Para confirmar esse padrão, a linhagem CDwxwx foi cruzada com a linhagem CAT-100-1 e sementes F1 foram analisadas. Como pode ser visto na Figura - 5, canaleta 2, o F1 apresentou três bandas de ADH:

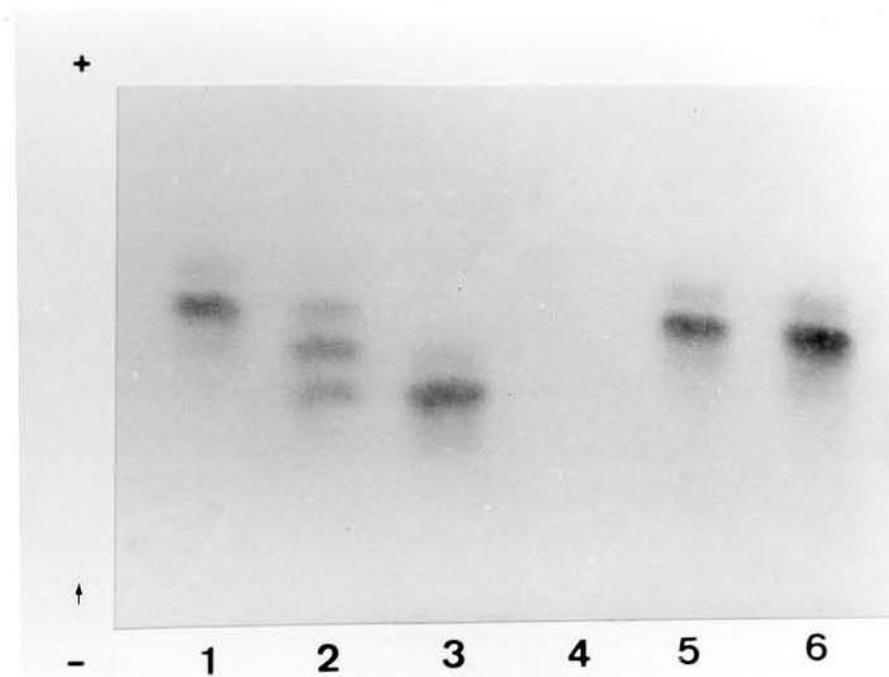


Figura - 5 Zimograma do sistema gênico Adh1 de milho em gel de amido-12%. A indução anaeróbica do escutelo resulta na expressão de polipeptídios que dimerizam aleatoriamente. (1) ADH1-FF (CAT100-1), resultante da expressão gênica do alelo Adh1-F, (2) ADH1-FS [F1(CAT100-1 x CDwxwx)] discriminação eletroforética dos três tipos de dímeros. A razão de atividade enzimática 1:2:1 representa realmente o nível protéico resultante da dimerização aleatória dos polipeptídios expressos dos isoalelos Adh1-S e Adh1-F intracelular. (3) ADH1-SS (CDwxwx) resultante da expressão gênica do alelo Adh1-S (Freeling & Scwartz, 1973). (4) ADH1-0 (2F11) nenhuma atividade enzimática é revelada pelo mutante (DÖring,H-P et al., 1984). (5) ADH1-FF (Linhagem de calos embriogênicos friáveis CAT100-1) nota-se um padrão de bandeamento eletroforético idêntico ao da linhagem que deu origem à cultura de tecidos. (6) ADH1-FF (A188) linhagem de milho norte americano (Brettell et al., 1986).

uma do tipo ADH-FF, resultante da interação entre polipeptídios correspondentes a expressão do alelo Adh1-F herdado do parental CAT-100-1 (Figura - 5, canaleta 1). Uma segunda banda do tipo ADH-SS resultante da interação dos polipeptídios correspondentes a expressão do alelo Adh1-S herdado do parental CDwxx (Figura - 5, canaleta 3) e uma terceira banda, intermediária, resultante da interação de polipeptídios S e F.

Para comparar os padrões eletroforéticos, obtidos para as nossas linhagens, com aqueles descritos na literatura para linhagens de milho americano, a linhagem A188 foi incluída em nossas análises. Essa linhagem apresentou o padrão típico FF, idêntico aos padrões FF apresentados pelas linhagens de nosso banco de germoplasma (Figura - 5, canaleta 6).

Como controle negativo foi utilizado o mutante Adh1-2F11. Como pode ser visto na Figura - 5 canaleta 4. O mutante não apresentou atividade enzimática correspondente a ADH.

Amostras de calos embriogênicos friáveis, derivados da linhagem CAT100-1, foram avaliadas quanto a atividade da ADH. Os calos apresentaram padrão idêntico àquele observado para amostras de escutelo da linhagem da qual se originaram (Figura - 5, canaleta 5). É interessante notar que as amostras de calos apresentam bandas intensas de ADH, possivelmente devido a indução da enzima proporcionada pela presença de 2,4 D no meio de cultura (Jacobs et al., 1985).

4.2 - Seleção de linhagens de calos deficientes em ADH.

4.2.1 - Efeito do álcool alílico sobre o crescimento de microcalos. Determinação da taxa de sobrevivência e I₅₀.

As características de friabilidade e uniformidade de resposta da linhagem de calos CAT-100-1 foram fundamentais para a condução dos experimentos de seleção. Essas características mantiveram-se constantes, durante as subculturas. Durante os experimentos de avaliação do efeito do álcool alílico e seleção de linhagens tolerantes não foram observadas alterações macroscópicas de textura ou cor dos calos.

O material utilizado para os estudos do efeito do álcool alílico e seleção de linhagens tolerantes consistiu de microcalos preparados a partir de calos embriogênicos friáveis (Figura - 6). Esses microcalos consistem de centros meristemáticos que se caracterizam por apresentar células arredondadas, citoplasmas densos e paredes celulares reduzidas, típicas de tecido com alta taxa de divisão celular e embriogênese. Ao microscópio óptico, os inúmeros centros meristemáticos de um calo são circundados por células maiores, vacuolizadas, com citoplasmas mais translúcidos, e de paredes celulares espessas, características de células diferenciadas e não embriogênicas (Fukuda & Komamine, 1985).

Os microcalos foram obtidos através da agitação dos calos embriogênicos friáveis em meio líquido. Durante este processo, ocorrem mudanças estruturais no calo maduro. Os núcleos meristemáticos desprendem-se da massa total do calo e são liberados no meio líquido. Após dupla filtração, obteve-se microcalos medindo entre 250 a 500 µm de diâmetro, os quais foram utilizados nos experimentos.

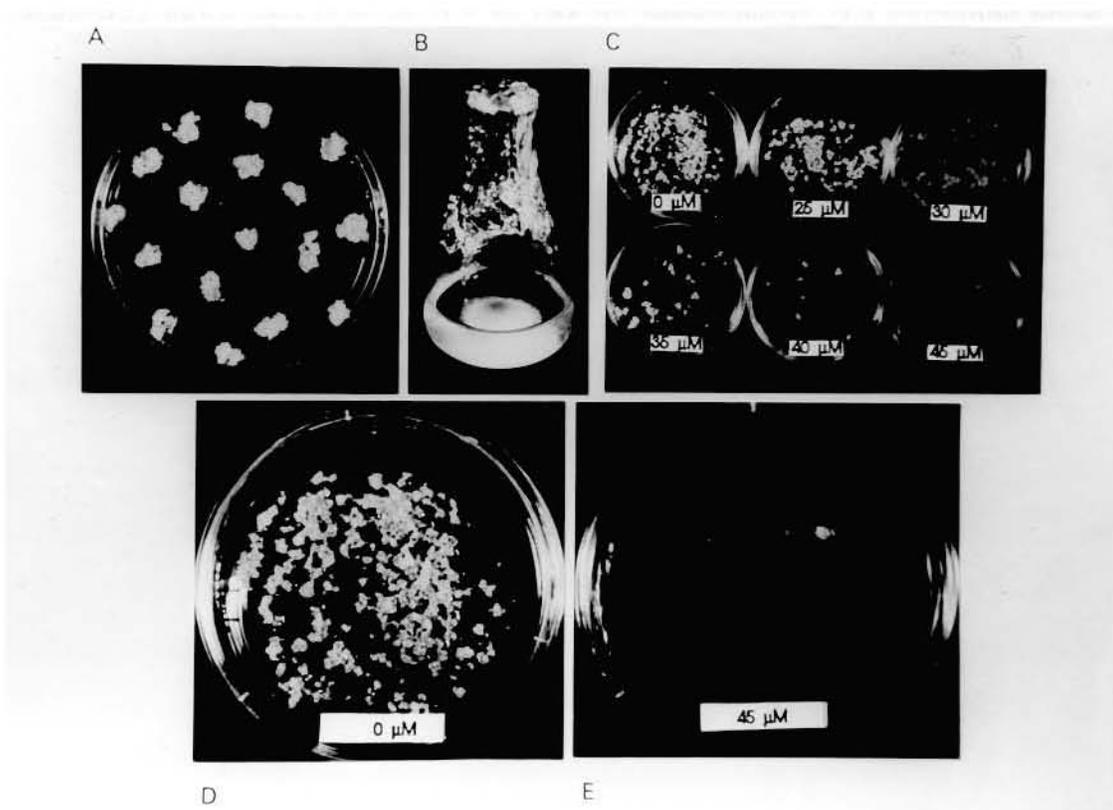


Figura - 6 (A) Linhagem de calos embriogênicos friáveis CAT100-1 em meio de manutenção CM-1. (B) Linhagem de microcalos CAT 100-1 medindo de 150 a 250 μm de diâmetro em meio líquido SM-1, 3g de calos embriogênicos friáveis CAT100-1 foram transferidos para um erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio SM-1. Após três dias de incubação a 26°C e sob agitação orbital constante, o material foi duplamente filtrado. (C) Efeito do álcool alílico sobre o crescimento de microcalos em meio CM-1, contendo 0, 25, 30, 35, 40 e 45 μM de álcool alílico, 3 a 4 semanas após o inóculo. (D) Microcalos apresentando crescimento normal em meio de cultura sem o agente seletivo. (E) Microcalos ADH-deficientes tolerantes a 45 μM de álcool alílico.

- 7.

4.2.2 - Análise dos microcalos tolerantes as altas concentrações de álcool alílico.

Para verificar se a tolerância dos microcalos tolerantes ao álcool alílico, era devida a ausência de atividade da ADH, cada um deles foi analisado quanto a atividade da enzima através de "dot blot" (Figura - 8). A maioria dos microcalos sobreviventes nas concentrações de 35, 40 e 45 μM de álcool alílico apresentou

Tabela - 4 Taxa de sobrevivência de microcalos em meio CM-1 contendo diferentes concentrações de álcool alílico.

[álcool alílico] (μ M)	n ^o repetições	Sobrevivência*		
		%	dp	
0	6	82,4	2,1	a**
10	6	78,8	1,4	a
15	5	80,5	2,8	a
20	5	79,1	3,2	a
25	6	80,1	3,4	a
30	6	78,2	4,6	a
35	5	11,0	2,2	b
40	6	4,8	3,9	c
45	6	1,1	1,2	c

* Calculada como o número de microcalos sobreviventes em relação ao número de microcalos plaqueados.

** Teste Tukey a nível de 5% de probabilidade. Médias com letras iguais não são diferentes significativamente.

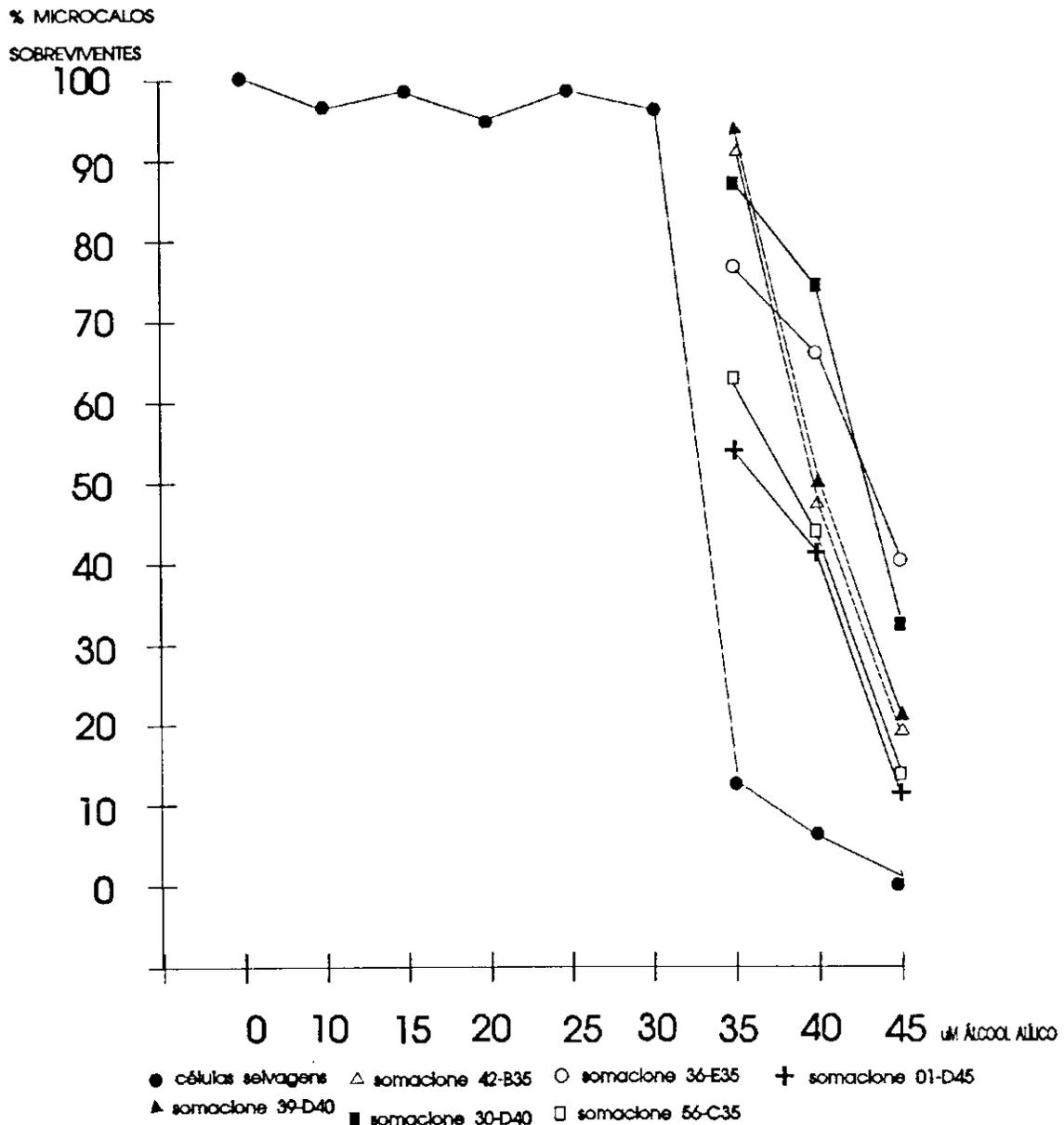


Figura - 7 Efeito seletivo do álcool alílico sobre o crescimento de microcalos CAT-100-1. A porcentagem de sobrevivência representa a média em relação ao controle [0 uM Álcool Alílico]. A concentração de 32,5 uM de Álcool Alílico inibe 50% do crescimento dos microcalos de células selvagens (I_{50} = 32,5 uM de Álcool Alílico). Os somaclones 30-D40, 39-C35, 36-E35, 56-C35 e 01-D45 apresentaram I_{50} superior a 37,5 uM de Álcool Alílico.

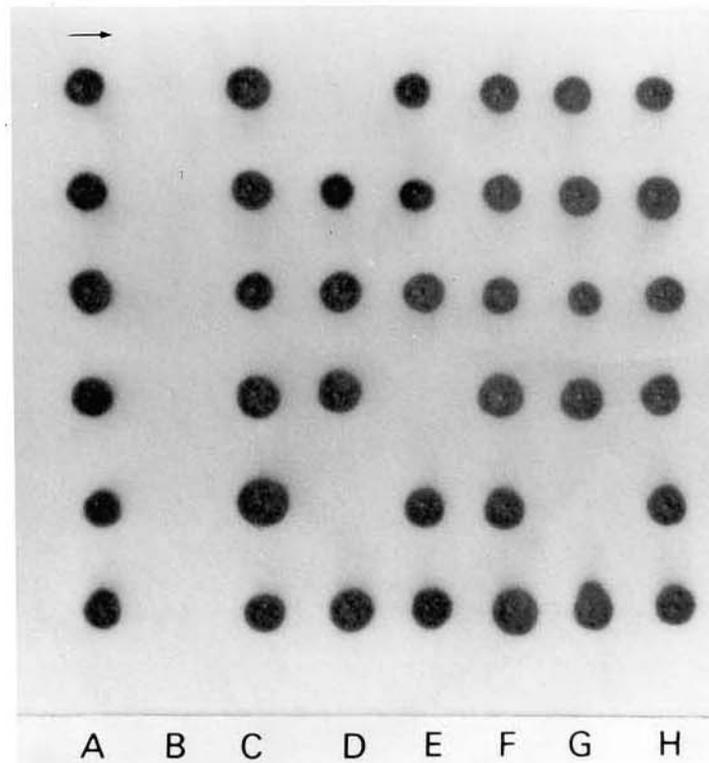


Figura - 8 Análise individual dos microcalos tolerantes a altas concentrações de álcool alílico. (A) Amostras extraídas de escutelos induzidos da CAT100-1 e (B) 2F11. (C) Microcalos CAT100-1 após 45 dias meio CM-1 sem álcool alílico. (D a H) Amostras extraídas de microcalos CAT100-1 tolerantes a 35, 40 e 45 μ M de álcool alílico. Cada mancha escura resulta da atividade da ADH em 1 μ l de extrato quando revelado especificamente. A seta indica a direção e sentido de aplicação das amostras no papel Whatman 3MM.

atividade normal de ADH. Entretanto, alguns microcalos apresentaram atividade de ADH muito baixa ou nula. Estes resultados indicam a existência de células capazes de tolerar o álcool alílico no meio de cultura, mesmo apresentando atividade normal de ADH, enquanto que outros apresentaram tolerância concomitantemente com a alteração da atividade da enzima. Para evitar possíveis escapes durante a derivação, através de repiques subsequentes dos somaclones em meio seletivo, foi utilizado o método de "dot blot" para verificar a atividade da ADH e repicando-se apenas os microcalos que não apresentavam atividade da enzima.

Os microcalos, assim selecionados, foram ampliados através de subculturas sucessivas, em meio não seletivo, sendo que a cada subcultura, o material foi analisado quanto a atividade da ADH. Desta forma, obtivemos quantidade suficiente de material para os experimentos subsequentes. Estes somaclones, após várias subculturas, foram utilizados para a preparação de microcalos, os quais foram plaqueados em meio CM-1, contendo 0, 35, 40 e 45 μM de álcool alílico, para verificar a estabilidade da tolerância ao agente seletivo. Microcalos sensíveis foram utilizados como controle (Figura - 9).

As taxas de sobrevivência apresentadas nas Tabelas - 4 e 5 foram calculadas de maneira diferente. Na Tabela - 4 a taxa de sobrevivência foi calculada como a razão entre a quantidade de microcalos sobreviventes ao final de 30 dias, (T30) e a quantidade de microcalos inoculados no início do experimento (T0). Na Tabela - 5 a taxa de sobrevivência foi calculada como a razão entre a quantidade de microcalos sobreviventes em uma determinada concentração após 30 dias (T30) e a quantidade de microcalos sobreviventes no mesmo período no controle. Essas duas estimativas são equivalentes, pois verificou-se uma correlação de 0,988 entre elas para as concentrações de 35, 40 e 45 μM .

Nem todos os somaclones, inicialmente ampliados a partir de microcalos tolerantes a 35, 40 e 45 μM de álcool alílico, mantiveram essa característica estabilizada após várias subculturas em meio não seletivo.

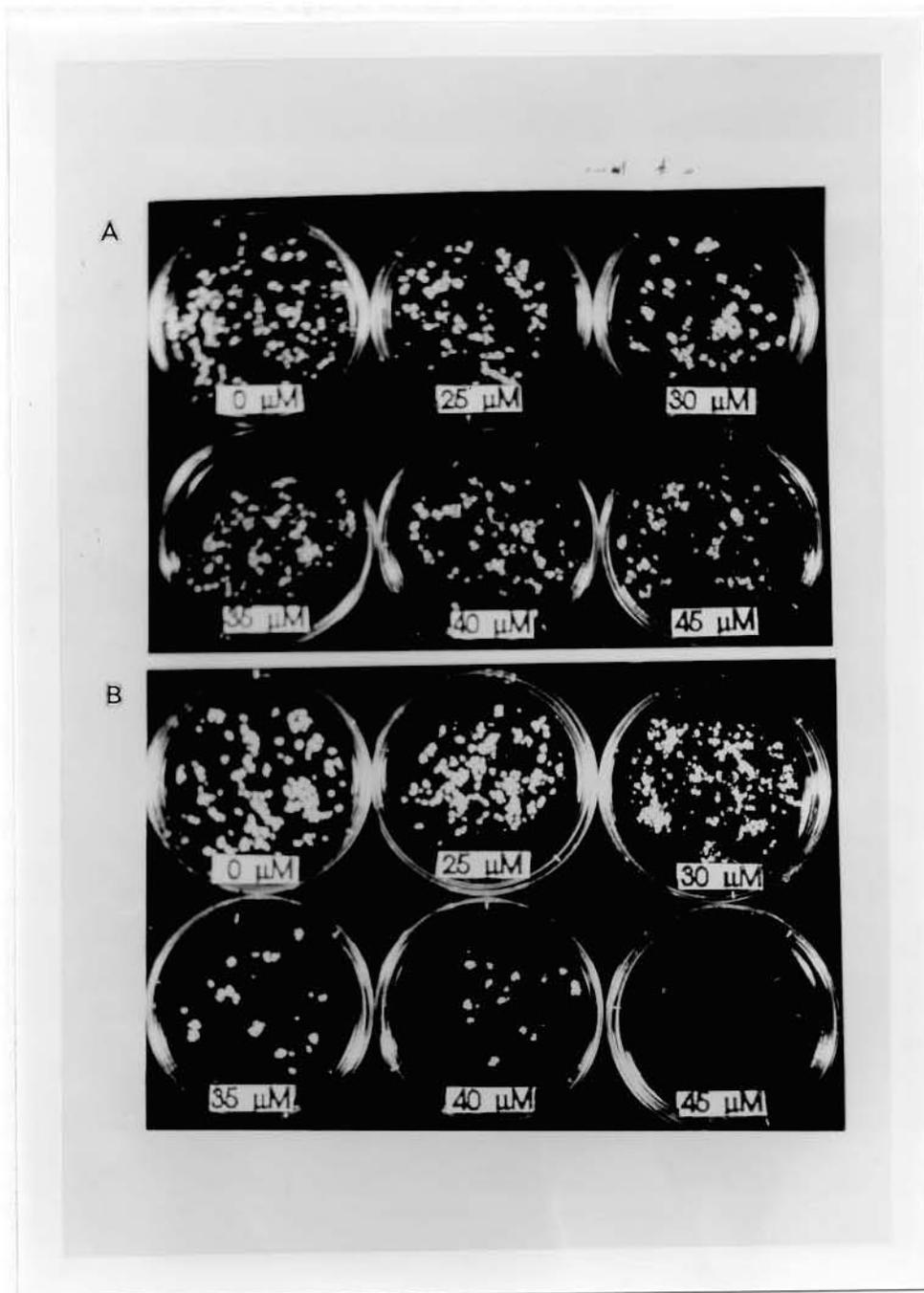


Figura - 9 Estabilidade da tolerância a altas concentrações de álcool alílico (0, 25, 30, 35, 40 e 45 μM). (A) Somaclone 39-C35 após a seleção e amplificação tolerante a até 45 μM de álcool alílico. (B) Linhagem de microcalos CAT100-1 controle, sensível às concentrações de 35, 40 e 45 μM de álcool alílico.

Tabela - 5 Taxa de sobrevivência de somaclones tolerantes ao álcool alílico submetidos a diferentes concentrações de álcool alílico.

Somaclone	Sobrevivência (%)*				
	[álcool alílico]				
	35 uM	40 uM	45 uM	Média	
30-D40	88,1**	75,0	32,1	65,0	a***
39-C35	94,3	50,1	20,5	55,0	a b
36-E35	77,9	66,5	39,1	61,2	a b
42-B35	91,3	47,7	20,8	52,3	b
56-C35	63,0	44,7	13,6	40,4	c
01-D45	55,8	45,7	12,6	38,0	c
04-A40	20,8	15,7	8,8	15,1	d
01-B40	36,2	8,2	0,5	15,0	d e
Controle	11,5	4,2	0,6	5,5	d e f
07-A35	22,7	0,7	0,0	7,8	d e f
17-B35	12,3	4,0	0,5	5,6	d e f
43-C35	11,5	1,4	0,0	4,3	d e f
0-D40	13,9	2,9	0,4	5,7	d e f
13-E35	9,8	3,6	0,0	4,5	d e f
05-E40	13,8	2,3	0,0	5,4	d e f
22-C40	11,5	0,9	0,0	4,1	e f
20-A35	3,4	1,9	0,0	2,0	f
07-D40	9,1	1,7	0,0	3,6	f

* A taxa de sobrevivência foi calculada com base no número de microcalos sobreviventes em uma determinada concentração de álcool alílico em relação ao controle, 30 dias após o plaqueamento.

** Valor médio de tres repetições

*** Teste Tukey a nível de 5 % de probabilidade. Médias com letras iguais não são diferentes significativamente.

Utilizando-se o Teste de Tukey, foi possível classificar dois grupos distintos de somaclones. Um primeiro grupo, constituído por 6 somaclones considerados tolerantes ao álcool alílico, apresentou média de sobrevivência entre 65,0 a 38,0%. O segundo grupo, de 11 somaclones, apresentou média de sobrevivência entre 15,1 a 3,6%, comportamento semelhante ao controle. A derivação de somaclones, através do método de "dot blot", pode resultar em seleção, que não necessariamente corresponda à tolerância ao álcool alílico. Isto pode ser explicado de acordo com o nível de sensibilidade do método.

A tolerância ao álcool alílico, nos somaclones selecionados, pode ser consequência de alterações nos mecanismos de regulação, ocorrendo uma diminuição da transcrição e/ou tradução e consequentemente queda da atividade enzimática.

Além disso, é possível que tenham ocorrido alterações a nível de estrutura gênica, havendo a dimerização natural dos polipeptídeos, porém com alterações a nível de sítio ativo da enzima.

4.3 - Variação somaclonal ocorrida no gene da Adh1.

4.3.1 - Análises bioquímicas.

4.3.1.1 - Atividade específica da ADH.

Com o objetivo de verificar se a tolerância ao álcool alílico apresentada de forma estável pelos somaclones foi devido a alterações na expressão da ADH, e não a outros fatores, foi feita a determinação da atividade específica da ADH. Desta forma, excluiu-se fatores tais como, permeabilidade da membrana citoplasmática e/ou via metabólica alternativa de degradação do álcool alílico.

Como pode ser visto na Tabela - 6, os somaclones tolerantes apresentaram uma redução na atividade específica da ADH que variou entre 2,5 a 12,7 vezes em relação ao controle. Embora bastante reduzida, a atividade de ADH encontrada nos somaclones tolerantes ao álcool alílico, poderia ser suficiente para produzir acroleína, e matar as células. Entretanto, como pode ser visto na Figura - 10, quando analisados em eletroforese em gel de amido, esses somaclones não apresentaram bandas de atividade correspondente a Adh1-F. Portanto a atividade encontrada poderia ser devido a outras isoenzimas de ADH (Shimamoto & King, 1983 e Widholm & Kishinami, 1988) com menor eficiência de transformação de álcool alílico em acroleína e que ainda teria algum poder de redução do etanol na reação.

Comparando-se os resultados da Tabela - 6 com aqueles da Tabela - 5, verificamos que aqueles somaclones apresentaram maiores taxas de sobrevivência na presença de álcool alílico e atividade específica da ADH reduzida. Ao contrário, o controle apresentou baixa taxa de sobrevivência na presença do agente seletivo e alta atividade específica para a ADH. Estas características foram inversamente proporcionais, quanto maior a taxa de sobrevivência, menor a atividade específica da ADH.

Durante o processo seletivo, comprovadamente o álcool alílico interferiu na viabilidade celular, sem que houvesse alguma barreira à sua difusão ou via metabólica alternativa para os somaclones descritos na Tabela - 6, ficando demonstrado assim a efetividade do álcool alílico em sistemas de seleção para obtenção de somaclones ADH-0 em milho.

4.3.1.2 - Inibição enzimática.

Para verificar se a diminuição da atividade da ADH dos somaclones foi devido a presença de um inibidor, ensaios para a determinação da atividade

Tabela - 6 Atividade específica da ADH dos somaclones tolerantes ao álcool alílico.

Somaclone	Atividade U.ml⁻¹	Proteína ug.ml⁻¹	Atividade Específica U.ug⁻¹ml⁻¹	(dp)
39-C35	118,12	17,08	6,80	0,25
42-B35	138,28	17,61	7,75	0,18
01-D45	53,01	14,89	3,48	0,36
56-C35	123,12	18,07	6,91	0,49
36-E35	763,07	44,00	17,61	1,11
30-D40	155,17	23,37	6,64	0,47
Controle	917,87	20,44	44,15	1,39

Cada valor representa a média de três repetições.

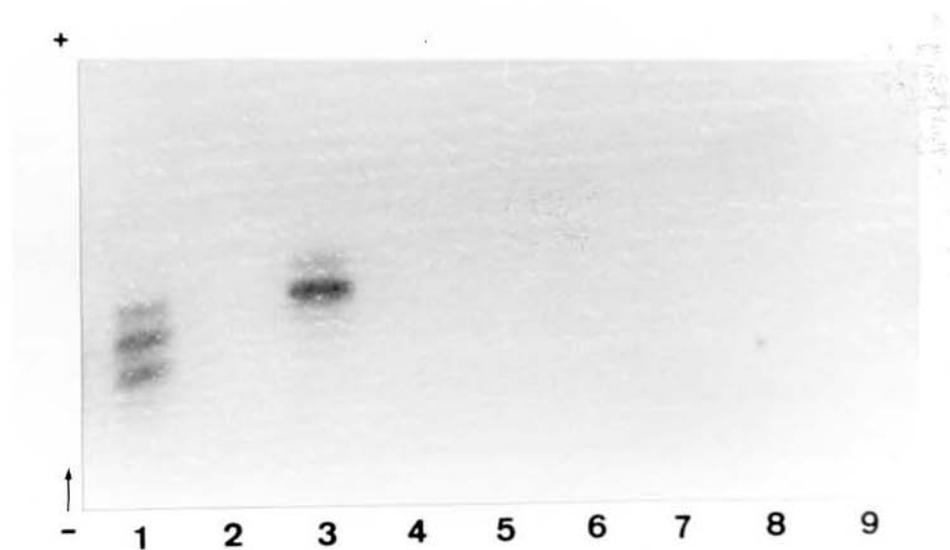


Figura - 10 Caracterização a nível eletroforético dos somaclones da linhagem CAT100-1. (1) F₁(CAT100-1 x CDwxwx) e (2) 2F₁₁ amostras extraídas de escutelo induzido. (3) Linhagem de calos CAT100-1. (4) 39-C35. (5) 42-B35. (6) 1-D45. (7) 56-C35. (8) 36-E35. (9) 30-D40. Eletrorese em gel de amido-12%

enzimática foram conduzidos, misturando-se na proporção de 1:1, extratos dos somaclones com aqueles do controle.

Caso o extrato de um determinado somaclone apresentasse algum inibidor, seria de se esperar que a atividade da ADH, fornecida em cerca de 90% pelo extrato do controle, diminuiria ao longo do tempo de incubação durante os experimentos. Na ausência de um inibidor endógeno, a atividade da mistura deveria corresponder a somatória das atividades dos dois extratos.

Como pode ser visto na Tabela - 7, as atividades encontradas nas misturas de extratos de todos os somaclones, corresponderam a aproximadamente a somatória das atividades, não tendo sido observada queda de atividade ao longo do tempo.

A análise estatística dos resultados revelou que, as diferenças devido ao tempo ou à interação entre tempo-extrato não foram significativas. Assim demonstrou-se que a redução na atividade da ADH nos somaclones tolerantes ao álcool alílico, não se deve ao aumento na concentração do inibidor endógeno da enzima descrito por Lai & Scandalios (1977 e 1982).

4.3.1.3 - Cinética enzimática.

A afinidade da enzima por seu substrato foi avaliada através do estudo das propriedades cinéticas da ADH de cada somaclone e da linhagem controle (Tabela - 8). Como deveríamos esperar, as V_{max} determinadas para os somaclones são menores que a do controle. Comparando-se os K_{ms} verificamos que não existem diferenças significativas entre os resultados, demonstrando assim que, a ADH dos somaclones tolerantes não possui alteração em seu sítio ativo que pudesse acarretar modificações na afinidade pelo seu substrato (Tabela - 9). Desta forma ficou demonstrado que, as alterações da atividade da ADH nos somaclones tiveram origem a nível de

Tabela - 7 Atividade da ADH de extratos controle (CAT-100-1) acrescidos na proporção de 1:1 de extratos dos somaclones tolerantes ao álcool alílico.

Extrato	Atividade (U.ml ⁻¹)		
	0 seg.	30 seg.	60 seg.
CAT-100-1	898,3*	856,3	834,6
CAT-100-1 + 39-C35	1005,3	984,6	953,6
CAT-100-1 + 42-B35	1114,6	1084,3	1078,3
CAT-100-1 + 01-D45	945,0	918,0	889,0
CAT-100-1 + 56-C35	1123,3	1081,0	1057,0
CAT-100-1 + 36-E35	1736,0	1714,0	1685,6
CAT-100-1 + 30-D40	1128,3	1110,0	1085,3

*Cada medida representa o valor médio de três repetições.

Tabela - 8 Velocidade máxima e K_m da ADH extraída da linhagem CAT-100-1 e dos somaclones resistentes ao álcool alílico.

Material	V_{max} $U.ml^{-1}.seg^{-1}$	(dp)	K_m uM	(dp)
39-C35	133,9	1,9	306,1	14,7
42-B35	158,2	2,2	297,6	14,5
01-D45	64,1	0,3	467,4	6,8
56-C35	137,9	1,7	285,7	12,5
36-E35	896,0	15,7	374,9	21,4
30-D40	183,0	1,6	391,6	10,7
Controle	1038,7	15,2	296,6	15,1

Tabela - 9 Teste "t" dos resultados do experimento de determinação e comparação dos K_{ms} dos somaclones em relação do controle (Tabela - 8).

Somacloes x Controle	t'	Grau de liberdade efetivo	t*
CAT-100-1 x 39-C35	0,782	3,99	2,776
CAT-100-1 x 42-B35	0,080	1,08	12,706
CAT-100-1 x 01-D45	17,891	2,77	3,182
CAT-100-1 x 56-C35	0,960	3,87	2,776
CAT-100-1 x 36-E35	5,223	3,61	2,776
CAT-100-1 x 30-D40	8,881	1,80	4,303

Foi aplicado o Teste "t" de acordo com a metodologia para amostras independentes com variâncias diferentes (Steel & Torrie, 1980).

*Nível de significância a 5%.

controle de sua expressão, e não a nível estrutural que causasse de modificação das propriedades cinéticas da enzima. Conforme demonstrado por Döring et al. (1984) mutantes de ADH, devido a inserção do elemento Ds, embora apresentem o peso molecular do mRNA alterado, decorrente da transcrição da inserção, a atividade da enzima não é completamente nula.

4.3.2 - Análise molecular.

4.3.2.1 - Alteração da transcrição ("Northern Blotting").

Uma vez constatado que, a redução na atividade da ADH dos somaclones tolerantes ao álcool alílico, não foi devido a alterações nas propriedades cinéticas da enzima ou pela presença de inibidor, foram feitas algumas análises moleculares para detectar possíveis alterações na estrutura e expressão do gene da ADH. Primeiramente foi determinado o conteúdo de mRNA específico da Adh1, através de "Northern Blotting" de amostras de calos frescos mantidos em meio CM-1.

O RNA total foi extraído de amostras de calos, filtrado através de membrana Hybond-MAP e o mRNA poli(A)⁺ foi eluído em água DEPC, incubando-se a membrana a 70°C por 5 minutos. A concentração de mRNA poli(A)⁺ foi determinada e o grau de purificação foi obtido, comparando-se com a quantidade de RNA total extraída (Tabela - 10).

A eletroforese da fração de mRNA poli(A)⁺ foi conduzida, aplicando-se 5 ug de RNA de cada amostra em um gel de agarose 1%. Após a eletroforese, o gel foi analisado com o auxílio de luz ultravioleta, observando-se em todas as

Tabela - 10 Concentração de RNA total e RNA poli(A)⁺ em amostras de calos da linhagem Cat-100-1 e dos somaclones resistentes ao álcool alílico.

Material	Peso fresco g	RNA total		RNA poli(A)		
		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ug	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	ug	% do total
39-C35	2,4	2,0	1.301	1,7	121,7	18,7
42-B35	3,3	2,0	844	1,8	148,3	17,6
01-D45	2,7	1,9	553	1,7	56,8	10,3
56-C35	3,2	2,0	1.285	1,7	206,6	16,1
36-E35	3,3	1,9	1.581	1,9	229,7	14,5
30-D40	4,0	1,9	1.246	1,8	189,4	15,2
Controle	2,2	1,9	1.091	1,8	196,6	18,0

amostras duas bandas correspondentes as unidades 18S e 25S de RNA ribossomal, que normalmente são abundantes em extratos de RNA total de eucariotos, e que aparecem em pequena proporção na preparação de mRNA poli(A) + (Figura - 11). Essas bandas podem ser utilizadas como marcadores de peso molecular, pois a unidade 18S mede aproximadamente 1,9 Kb e a unidade 28S aproximadamente 3.6 Kb (Dyers, 1979).

Os RNAs poli(A) + resolvidos no gel de agarose foram transferidos para membrana Hybond-mAP, utilizando-se o sistema de fluxo direcionado por capilaridade.

Um fragmento de DNA, correspondente ao gene da ADH clonado no plasmídeo pBR322, foi digerido com a enzima de restrição Hind III (Pharmacia) e o inserto pH2,3 foi purificado através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura - 12). Após a eletroforese, o inserto foi removido com papel DEAE-celulose, eluído com tampão (Tris-HCl, EDTA e NaCl), e marcado com [alfa³²P]dCTP, obtendo-se uma marcação de $2,76 \times 10^8$ CPM/ug de inserto, correspondendo a um rendimento de aproximadamente 80%. O filtro de mRNA poli(A) + foi hibridizado com a sonda pH2.3 a 42°C durante a noite, lavado e exposto por 6 dias a filme de Raio X (Siegel, 1986) (Figura - 13).

Na análise do "Northern Blotting", o controle de hibridização (Figura - 13, canaleta - 1) apresentou duas bandas. Uma banda intensa correspondente ao fragmento de 2,3 Kb, enquanto que uma segunda, de menor intensidade, apresentando 4,4 Kb, demonstrou baixa homologia com a sonda. Esta banda corresponde ao fragmento do plasmídeo pBR322.

A linhagem controle CAT-100-1 demonstrou possuir uma banda forte de aproximadamente 1,7 Kb (Figura - 13, canaleta - 2). Esta banda corresponde ao mRNA poli(A) + da ADH, pois este tamanho equivale a somatória de todos os exons existentes no gene da Adh1 (Figura - 14). Sutton et al. (1984) obtiveram o mesmo tamanho para o mRNA poli(A) + da ADH de milho quando com-

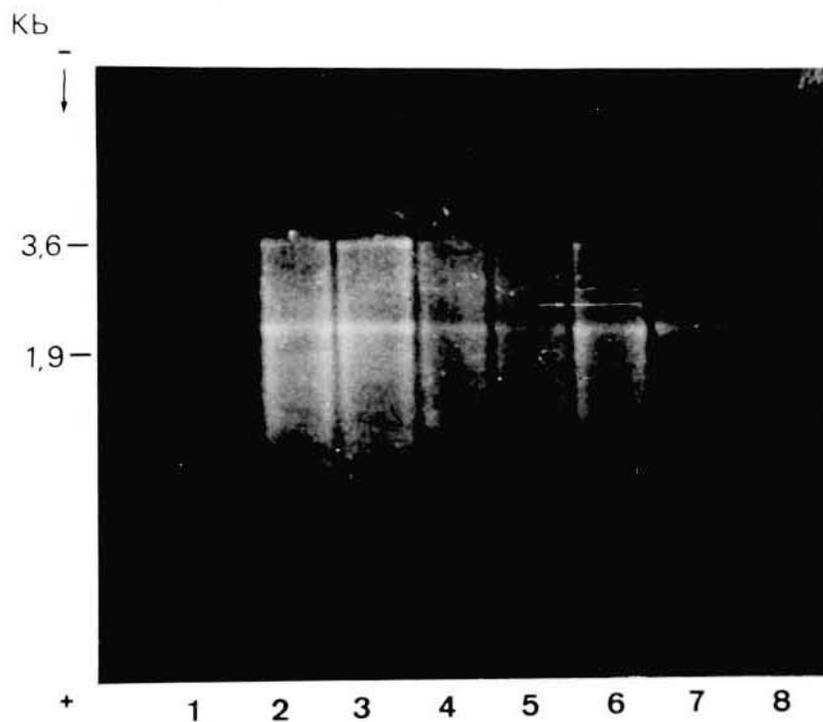


Figura - 11 Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos RNAs poli(A)⁺. (1) Plasmídio pBR322 pH2.3. (2) Linhagem de calos CAT100-1. (3) 39-C35. (4) 42-B35. (5) 1-D45. (6) 56-C35. (7) 36-E35. (8) 30-D40. Os RNAs totais foram extraídos com fenol e precipitados com LiCl (2,5 M) e os RNAs poli(A)⁺ foram purificados em membrana Hybond-mAP e ressuspensos com água. As bandas de 1,9 Kb e 3,6 Kb representam as unidades de 18S e 25S de RNA ribossomal.

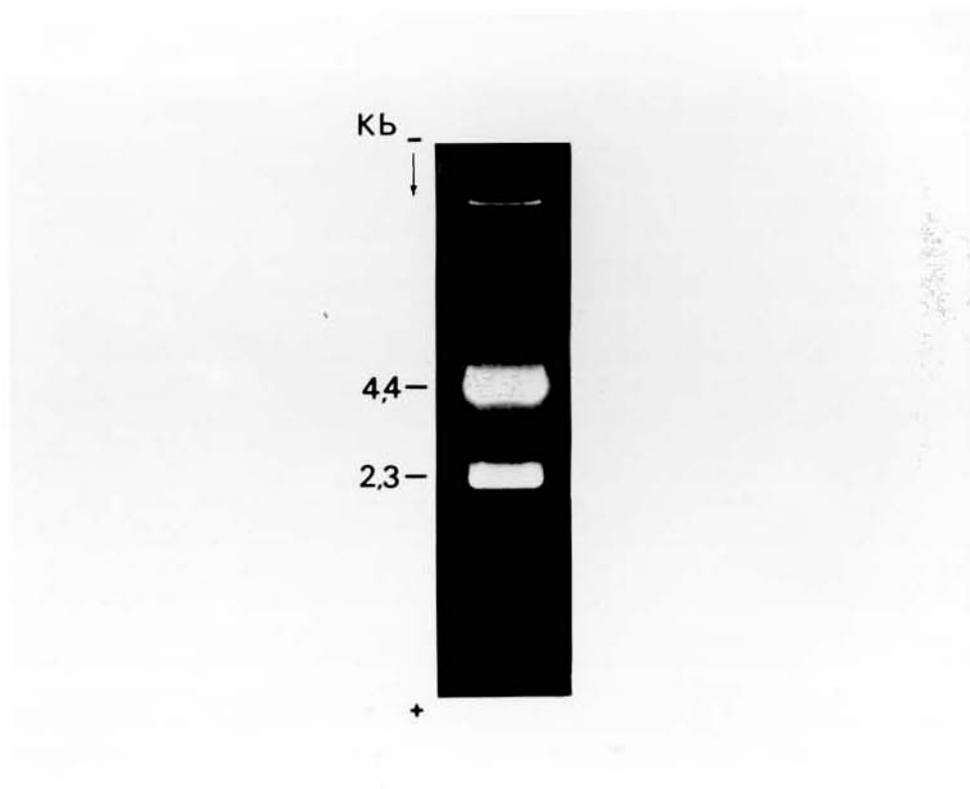


Figura - 12 Eletroforese em gel de agarose 1 % de DNA plasmidial (pBR322 pH 2.3) para purificação do inserto de 2,3 Kb. O DNA plasmidial foi purificado em gradiente de CsCl ($n = 1.38860$) e digerido com Hind III. O inserto foi retirado do gel utilizando papel DEAE-celulose (Whatman DE81) e eluído com tampão tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, NaCl 1,5 M.

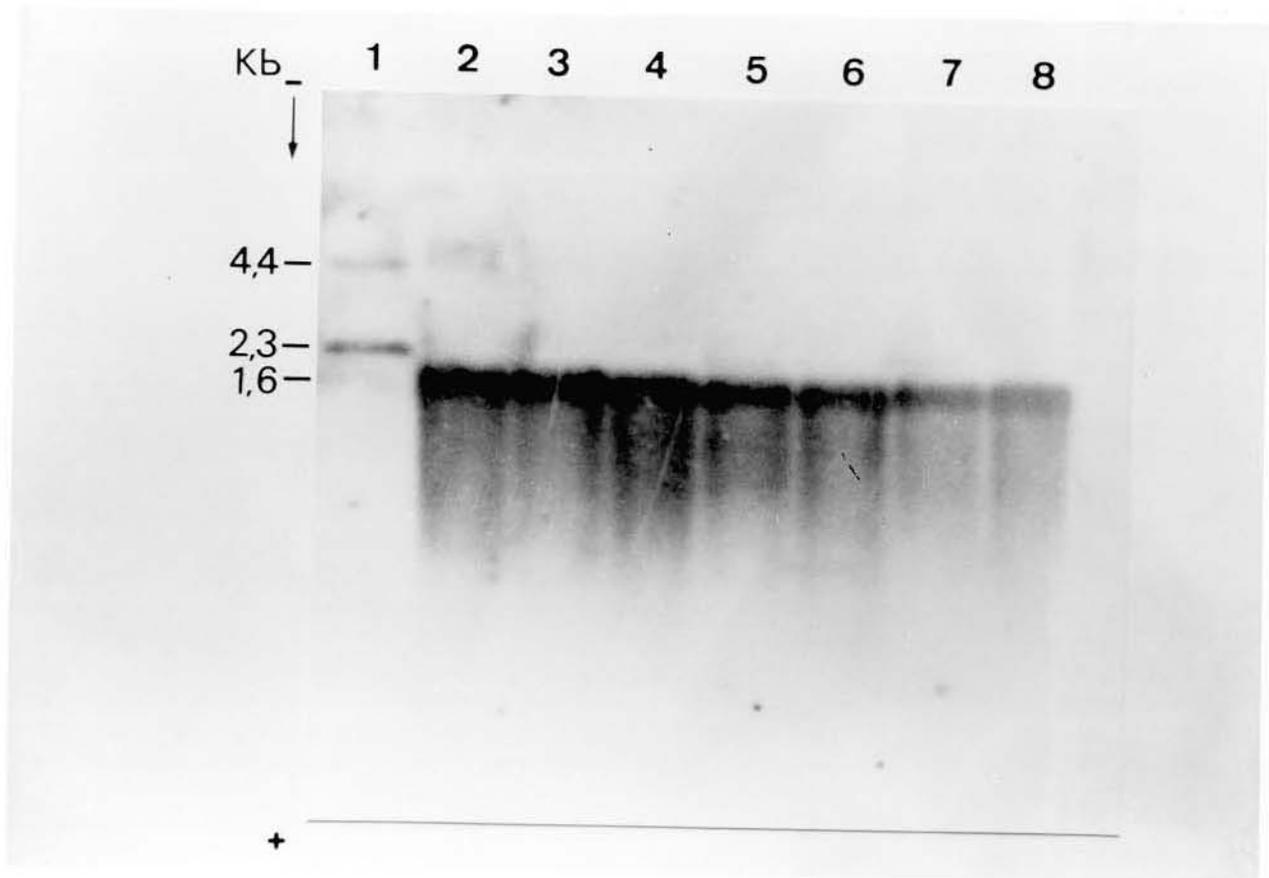


Figura - 13 Os RNAs poli(A)⁺ dos somaclones foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, transferidos para membrana de nylon (Hybon-N) e hibridizados com a sonda ADH-pH2.3. (1) DNA plasmidial pBR322 pH 2.3 digerido com Hind III; controle de hibridização. (2) Linhagem de calos CAT100-1. (3) 39-C35. (4) 42-B35. (5) 1-D45. (6) 56-C35. (7) 36-E35 e (8) 30-D40. Após a hibridização o filtro radioativo foi exposto a filme de Raio-X durante 6 dias, filme foi revelado e fotografado.

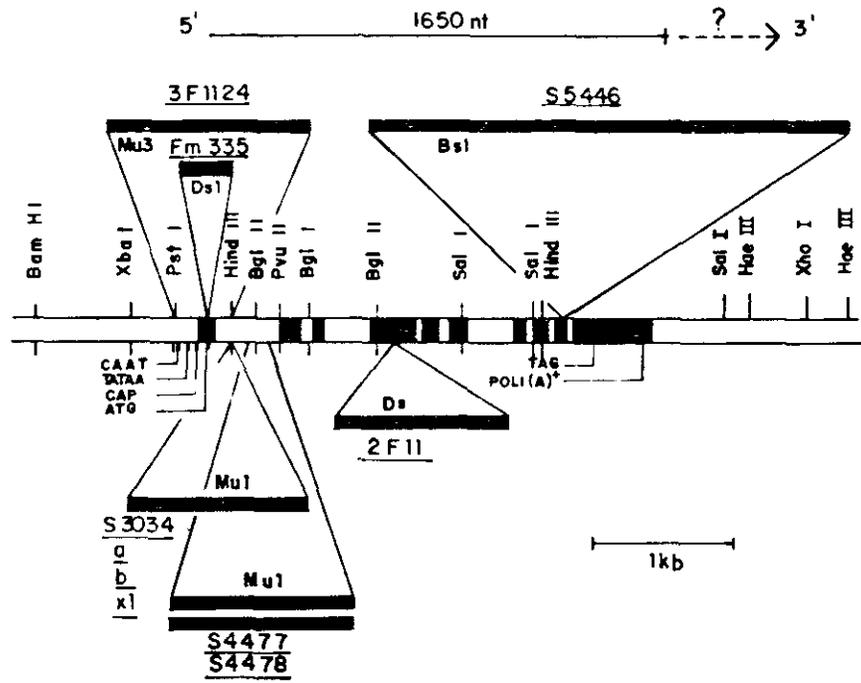


Figura - 14 Estrutura gênica da Adh1 e inserções descritas. No diagrama nove introns são indicados pelos retângulos em branco e dez exons representados pelos retângulos em preto. Os retângulos pontilhados representam seis sequências de DNA inseridos no gene. Todas as inserções, as quais representam três famílias (4Mu, 2Ds e 1 Bs1) reduzem parcial ou totalmente a expressão gênica nas plantas. Alguns sítios de restrição são mostrados. A região adjacente flanqueadora representada pelos CCAAT e TATAAC boxes, CAP indica o início da transcrição, ATG e TAG são pontos de início e

pararam o mutante Adh1-F335 com o progenitor normal, hibridizando a membrana de mRNA poli(A) + com a sonda do inserto do plasmídio pZML84.

Todos os somaclones analisados apresentaram o mesmo padrão de bandeamento do controle, evidenciando a presença do mRNA poli(A) + da ADH (Figura - 13, canaletas - 3 a 8). Nenhum deles apresentou ausência do mRNA poli(A) + ou alteração do seu tamanho.

Algumas diferenças foram observadas para as quantidades de mRNA poli(A) + dos somaclones, quando comparados com o controle (Tabela - 11). Todos os somaclones apresentaram níveis do transcrito da ADH reduzidos, visto que as áreas relativas obtidas por densitometria, correspondentes aos picos de leitura, foram inferiores em relação ao controle. Os somaclones 1-D45 e 56-C35 destacaram-se por apresentarem uma redução de aproximadamente 50% da quantidade do mRNA poli(A) + específico da ADH.

4.3.2.2 - Análise molecular do gene da Adh1 "(Southern Blotting)".

Amostras de plântulas das linhagens ADH1-2F11 e CAT-100-1, de calos da linhagem CAT-100-1 e dos somaclones tolerantes ao álcool alílico, foram utilizadas para extração do DNA genômico (Tabela - 12). O DNA genômico desses materiais foi utilizado para a análise molecular do gene da Adh1. Dez microgramas de DNA de cada amostra foram digeridas com as enzimas de restrição Hind III e Eco RI e separadas em gel de agarose 1% (Figura - 15). Os DNAs foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com a sonda pH2.3 (Figura - 16).

O plasmídio pH2.3, que nos experimentos de "Southern Blotting" também foi utilizado para controle de hibridização, quando digerido com a enzima Hind III, revela uma banda de 2,3 Kb, correspondente aos exons centrais (Figura - 2) do gene da ADH1.

Tabela - 11 Quantidade de mRNA poli(A)⁺ específico da ADH nos somaclones tolerantes ao álcool alílico.

Somaclones	mRNA poli (A) ⁺	
	Área do pico (cm ²)	Área relativa (%)
39-C35	3,617	83,90
42-B35	3,266	75,76
01-D45	2,196	50,94
56-C35	2,132	49,46
36-E35	2,630	61,01
30-D40	3,410	79,09
controle	4,311	100,00

Tabela - 12 Determinação da concentração de DNA total extraído dos somaclones utilizados para "Southern blotting" na verificação de alterações do peso molecular e/ou sítios de restrição que afetariam o locus da Adh1.

Material	Peso fresco g	R A₂₆₀/A₂₈₀	C ug de DNA.ml⁻¹
Adh1-1F11	23,0	1,9	54,5
CAT100-1	20,0	1,8	61,0
Controle	5,0	1,9	53,2
39-C35	4,5	1,9	52,4
42-B35	4,8	1,7	48,8
01-D45	4,4	1,8	58,0
56-C35	5,3	1,9	34,4
36-E35	3,6	1,9	48,8
30-D40	3,4	1,8	22,5

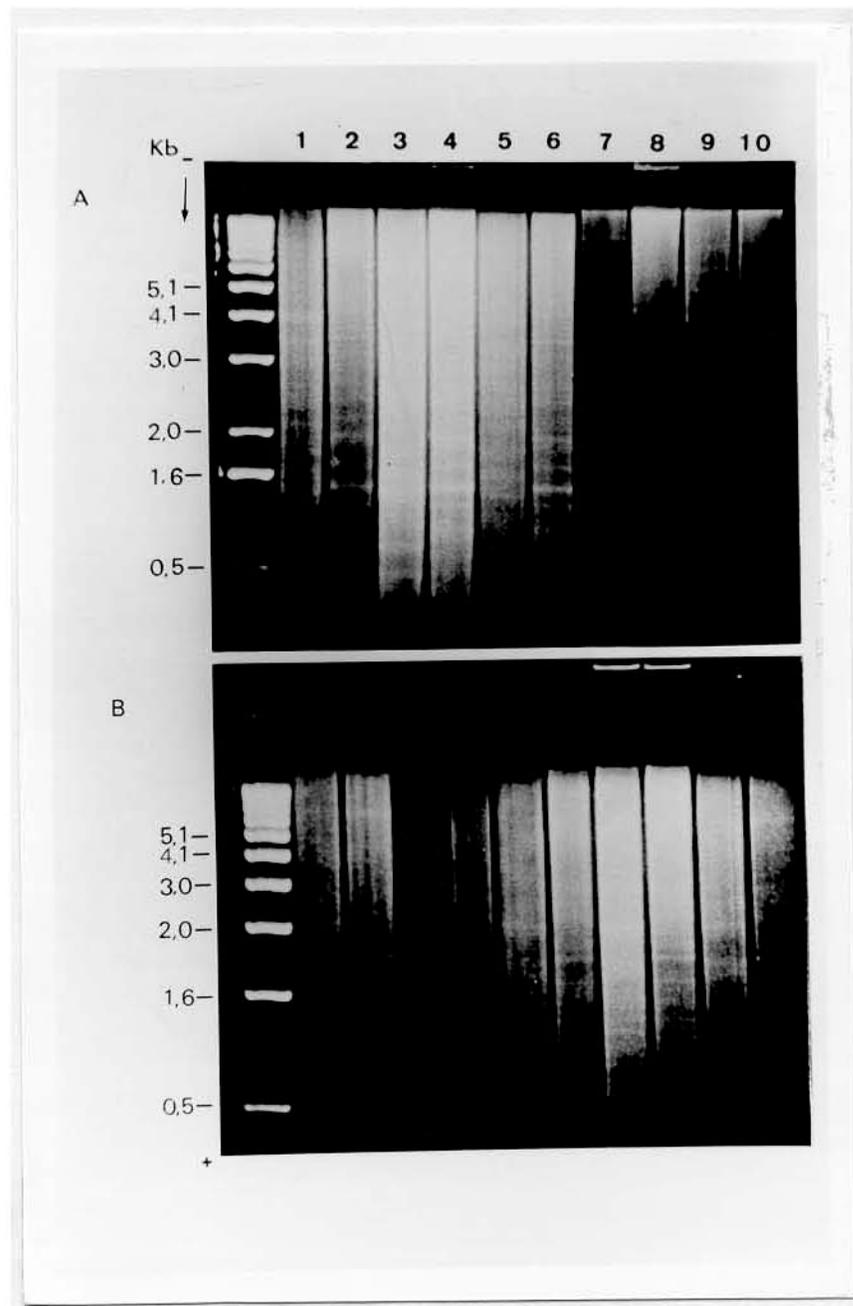


Figura - 15 Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 5 ug de brometo de etídio, os DNAs genômicos de milho. (A) Digestão com Hind III e (B) Digestão com Eco RI. (1) Plasmídeo pH2.3, (2) Mutante 2F11, (3) Linhagem CAT100-1, (4) Calos da linhagem CAT100-1, (5) 39-C35, (6) 42-B35, (7) 1-D45, (8) 56-C35, (9) 36-E35 e (10) 30-D40.

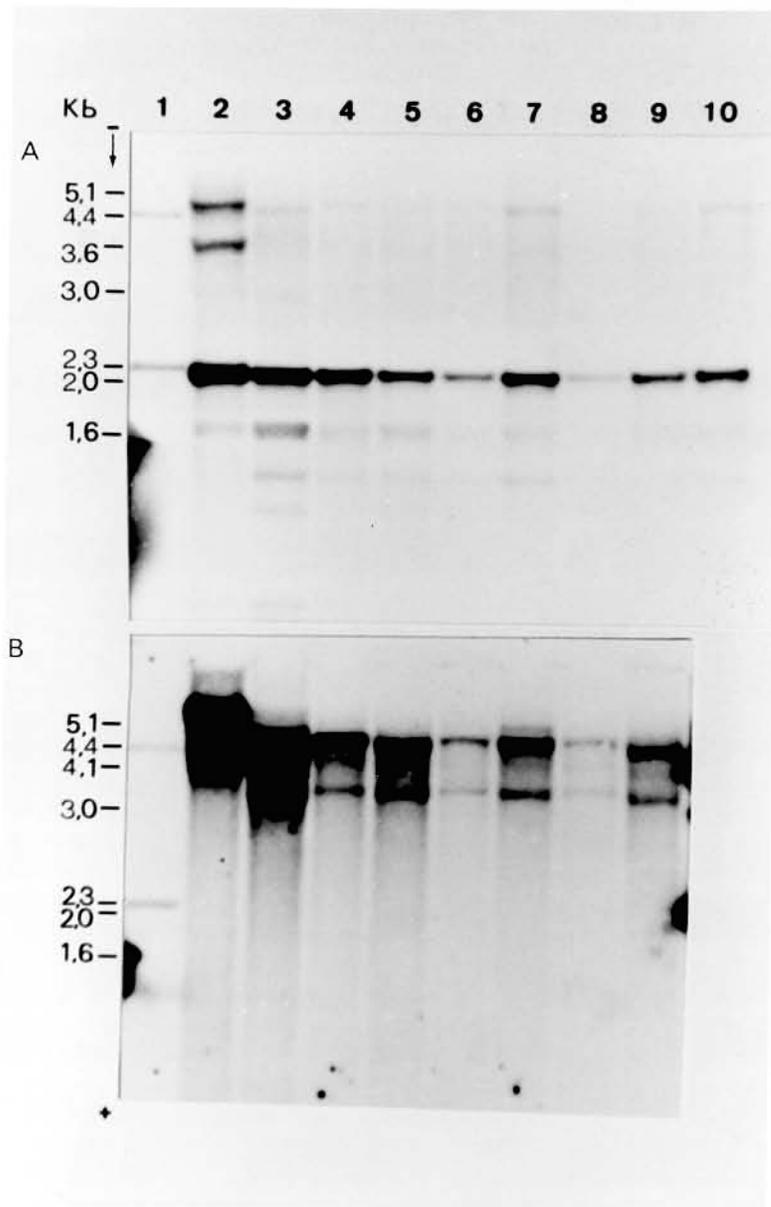


Figura - 16 "Southern blotting": Os DNAs genômicos foram digeridos com Hind III (A) e Eco RI (B). Os fragmentos foram submetidos à eletroforese, transferidos para membranas de nylon (Hybond-N) e hibridizados com a sonda ADH1-pH 2.3. (1) Plasmídeo pBR 322 ADH-pH 2.3 digerido com Hind III usado como controle de hibridização, (2) Mutante Adh1-2F11, (3) Linhagem CAT100-1, (4) Calos da linhagem CAT 100-1, (5) 39-C35, (6) 42-B35, (7) 1-D45, (8) 56-C35, (9) 36-E35 e (10) 30-D40. Após a hibridização o filtro radioativo foi exposto a filme de Raio-X durante 48 horas, que foi revelado e fotografado.

Uma banda correspondente ao fragmento de 2,3 Kb do pH2.3 foi observada nas amostras de plântulas e calos da linhagem CAT-100-1 (Figura - 16, canaleta - 3) e em todos os somaclones tolerantes ao álcool alílico, quando os DNAs foram digeridos com Hind III (Figura - 16, canaletas - 4 a 10). O mutante ADH1-2F11 (Figura - 16, canaleta - 2), em adição ao fragmento de 2,3 Kb, apresentou também uma banda de aproximadamente 3,6 Kb, que corresponde ao alelo *adh1-2F11* deste material. Este alelo foi descrito por Döring et. al. (1984) e normalmente ocorre devido a presença de um elemento de transposição. Ele possui uma inserção Ds de 1,3 Kb no quarto exon da *Adh1*, justificando assim a banda de 3,6 Kb, que é resultante da adição ao fragmento Hind III, de 2,3 Kb (Figura - 3 e Figura - 14).

A digestão com a enzima Eco RI produziu fragmentos maiores, de tamanho acima de 4,1 Kb, de forma a englobar todo o gene da *Adh1*. A análise revelou que, aparentemente, não existem grandes diferenças entre os genes dos somaclones tolerantes ao álcool alílico e os controles do experimento.

Esses resultados mostram que aparentemente não houveram alterações estruturais no gene da *Adh1* dos somaclones tolerantes ao álcool alílico, pelo menos quando analisado através da digestão com a enzima Hind III e Eco RI. A sugestão que parece mais razoável é que tenha havido alterações em pelo menos uma base ou poucas bases que não sejam identificáveis com as enzimas utilizadas.

5 - DISCUSSÃO

A variação somaclonal, observada em diferentes espécies de plantas foi estudada no presente trabalho tomando-se como modelo o sistema genético da ADH. Em primeiro lugar, analisou-se a variabilidade genética para o locus da ADH em linhagens homocigóticas de milho do banco de germoplasma do Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, com o objetivo de se determinar a frequência de variantes que ocorrem espontaneamente nesse germoplasma. O padrão isoenzimático revelou a existência de baixo polimorfismo para esse locus, sendo observado apenas um variante do Tipo ADH1-SS dentre 40 linhagens analisadas (Figura - 8). Esse resultado mostra que o locus é bastante estável, pois as linhagens analisadas foram derivadas de diferentes populações, através de um processo longo de autofecundações sucessivas. Esse trabalho inicial também foi utilizado como base para avaliar os padrões eletroforéticos da ADH nas linhagens de células utilizadas no estudo da variação somaclonal. Uma vez que as linhagens de células foram derivadas de linhagens de milho do germoplasma analisado, deveria ser esperado o mesmo padrão eletroforético da ADH.

Células embriogênicas da linhagem CAT100-1 foram utilizadas para o estudo da ocorrência de mutantes ADH-deficientes, devido a variação somaclonal. Foi utilizado o álcool alílico como substrato alternativo da ADH, cujo

produto, acroleína, é tóxico a nível celular (Megnet, 1967). A concentração de álcool alílico utilizada para a determinação da taxa de sobrevivência e I_{50} dos microcalos foi ao redor de 30 μM (Figura - 7). Esta concentração foi superior àquela utilizada por Widholm & Kishinami (1988) para selecionar células de *Nicotiana plumbaginifolia* tolerantes ao álcool alílico, através de um sistema de cultura de células em suspensão. Neste sistema, a concentração I_{50} girou ao redor de 10 μM . A diferença encontrada entre os dois sistemas se deve a natureza dos mesmos, pois no sistema de meio sólido, o álcool alílico é adicionado com o meio ainda quente, a uma temperatura aproximadamente de 30°C. Isso pode acarretar na evaporação parcial do agente seletivo durante a preparação, o que não ocorre com o meio líquido, pois o álcool alílico é adicionado a temperatura ambiente. Um outro aspecto que pode estar influenciando, refere-se a estrutura dos microcalos em meio sólido, pois sendo estruturas mais organizadas e complexas, podem dificultar a distribuição homogênea do agente seletivo, formando gradiente de concentração desde o meio de cultura até as estruturas celulares em crescimento. No caso do meio líquido, o sistema celular consiste de aglomerados de poucas células em constante agitação, permitindo uma distribuição homogênea em todo o sistema, resultando em maior efetividade do agente.

A estratégia utilizada para a seleção de variantes ADH-deficiente, monitorando-se a atividade através do método de "dot blot" durante os repiques, mostrou-se bastante eficiente obtendo-se vários somaclones. Alguns desses somaclones mantiveram a tolerância (Tabela - 5) apresentando I_{50} acima de 37,5 μM de álcool alílico. A análise da atividade específica da ADH dos somaclones revelou níveis reduzidos quando comparados com o controle, sugerindo que quanto menor a atividade, maior a tolerância ao álcool alílico (Tabelas - 5 e 6). A associação entre a tolerância ao álcool alílico e a redução da atividade da ADH também foi observada em várias espécies de plantas, microrganismos e insetos (Megnet, 1967, Sofer & Hatkoff, 1972; Widholm & Kishinami, 1988).

Uma vez comprovada a diminuição da atividade enzimática nos somaclones tolerantes ao álcool alílico, passou-se a analisar suas causas. Conforme observado por Lai & Scandalios (1977 e 1982), a ADH é regulada por um inibidor endógeno de natureza protéica, presente no endosperma de milho. Assim a atividade da enzima é dependente da concentração do inibidor, a qual é variável dependendo do tecido e do estágio do desenvolvimento. Este tipo de regulação ocorre em diversos sistemas enzimáticos (Efron & Schwartz, 1968) e normalmente pode ser detectado, misturando-se extrato a ser testado com um extrato que tenha alta atividade da enzima. A inibição da atividade da enzima neste caso revela a presença de inibidor. Os resultados da Tabela - 7 comprovam a inexistência de um inibidor protéico, visto que a atividade nas misturas de extratos não foi reduzida significativamente. A ausência de um inibidor de natureza protéica, nos somaclones, também pode ser deduzida quando extratos destes foram submetidos a eletroforese em gel de amido. Neste caso não foi observada nenhuma banda de atividade de ADH (Figura - 10) a qual, se estivesse inibida por um inibidor de natureza protéica, teria sido separado da enzima no gel.

Uma vez constatado que a redução na atividade da ADH dos somaclones não era devida a presença de um inibidor endógeno, passou-se a estudar se a mesma estava sendo causada por alterações nas propriedades físico-químicas da enzima. Alguma alteração a nível estrutural que modificasse o sítio ativo da enzima não afetaria os níveis de transcrição e tradução, porém poderia afetar a afinidade da enzima pelo seu substrato. Este tipo de evento tem sido detectado em vários mutantes enzimáticos de microrganismos e de plantas (Freelinf & Bennett, 1985). O estudo das propriedades cinéticas da ADH não mostrou nenhuma alteração significativa na maioria dos somaclones em relação as células controle (Tabela - 8).

Esses resultados indicam que a atividade da ADH nos somaclones deve estar sendo afetada por fatores envolvidos na regulação da expressão gênica e não na regulação a nível metabólico.

A regulação da expressão do gene da ADH foi investigada a nível de transcrição e a nível da estrutura do gene. Tem sido observado vários mutantes deficientes em atividade da ADH em milho e em outras espécies de plantas, nas quais a ausência de atividade pode ser devido a mutações no seu promotor, diminuindo ou mesmo inibindo completamente a transcrição (Johns et al., 1983). Muitas vezes a mutação no promotor pode ocorrer por deleção ou inserção de um transposon (Dennis et al., 1984; Dennis et al., 1986). Por outro lado, alterações na região codificadora do gene, seja por mutação simples ou por inserção de transposon, pode inibir a transcrição, produzir um transcrito truncado ou mesmo um transcrito instável (Merckelbach et al., 1986). Essas alterações poderiam ser detectadas através da análise de "Southern e Blotting" e "Northern Blotting". Entretanto "Northern Blotting" (Figura - 13) e Southern Blotting" (Figura - 14) dos somaclones deficientes em ADH não mostraram alterações que pudessem indicar problemas na estrutura e expressão do gene da ADH dos somaclones. Assim, é provável que a ausência de atividade da ADH nos somaclones seja devida a algum outro ponto de regulação, talvez a nível de tradução. Esse tipo de alteração poderia ser explicado por uma substituição, adição e/ou deleção de uma única base, alterando completamente o quadro de leitura, porém não alterando o tamanho ou a estrutura do gene e a expressão do seu mRNA.

A obtenção e caracterização desses somaclones evidencia a ocorrência de fenômenos, intrínsecos à cultura de tecidos vegetais, que foram capazes de gerar variabilidade genética em milho. A caracterização dessa variabilidade, considerada a nível de uma ou poucas bases, seria possível através da clonagem e sequenciamento das bases do gene da ADH dos somaclones e comparação com aquelas do gene original. Assim, verificar-se-ia as possíveis alterações que estariam afetando a atividade da enzimática e/ou expressão da ADH dos somaclones.

6 - CONCLUSÕES

- O sistema celular utilizado no presente trabalho, pela sua uniformidade de resposta e facilidade de manipulação, mostrou-se bastante eficiente no estudo da variação somaclonal em milho.

- Somaclones de milho tolerantes ao álcool alílico foram isolados de cultura de células, sem qualquer tratamento com agentes mutagênicos. Vários dos somaclones selecionados apresentaram deficiência da atividade da ADH, mostrando que a redução da atividade de ADH impediu a transformação de álcool alílico em acroleína, sendo esse o mecanismo de tolerância.

- O estudo de algumas propriedades físico-químicas da ADH dos somaclones tolerantes, não revelou qualquer alteração significativa em relação às células controle. Os resultados demonstraram que a redução da atividade enzimática dos somaclones não deve ser atribuída à presença de inibidor e nem a alterações no sítio ativo da enzima, que pudessem modificar sua afinidade pelo substrato.

- O estudo da expressão do gene *Adh1*, através da análise de "Northern Blotting", mostrou que todos os somaclones ADH-deficientes apresentaram menor teor de mRNA poli(A)⁺ específico de ADH. Entretanto, não se pode descartar que, mesmo reduzida, a quantidade mRNA poderia ser suficiente para

a produção de um número de moléculas de ADH capazes de converter o álcool alílico em acroleína a níveis tóxicos.

- A análise da estrutura do gene da ADH dos somaclones tolerantes através de "Southern Blotting" não apresentou nenhuma modificação de tamanho em relação as células controle. Para esta análise utilizou-se duas enzimas de restrição, Hind III e Eco RI, que geram fragmentos de aproximadamente 80% do gene Adh1 e fragmentos de 4,1 Kb contendo o gene Adh1 e suas regiões adjacentes.

- Os somaclones apresentaram níveis reduzidos de expressão do gene Adh1. É possível que essa redução seja decorrente de alterações, tais como substituição, adição ou deleção de uma ou poucas bases, em regiões regulatórias, que não puderam ser detectadas através das análises empregadas.

-No presente trabalho ficou demonstrado a possibilidade de se estudar a variação somaclonal em milho, através do sistema gênico da ADH. Estudos semelhantes em outras espécies poderão ser realizados, utilizando-se as mesmas estratégias empregadas.

7 - RESUMO/ABSTRACT

Utilizando o sistema gênico da álcool desidrogenase (ADH) em milho como modelo de estudo, foram analisados alguns aspectos com relação a origem e a natureza da variação somaclonal em cultura de tecido de milho. Vários somaclones deficientes em ADH foram obtidos e caracterizados a nível bioquímico e molecular.

Para obtenção dos somaclones deficientes em atividade de álcool desidrogenase utilizou-se o álcool alílico como agente seletivo em cultura de células de milho. O álcool alílico, quando adicionado ao meio de cultura, é oxidado transformando-se em acroleína, ocasionando a morte das células normais. As células que não possuem atividade da ADH não fazem a conversão do álcool alílico em acroleína, portanto não são afetadas.

Observou-se uma redução de 50% no crescimento dos microcalos de milho quando esses foram cultivados em meio contendo álcool alílico nas concentrações acima de 32,5 μ M. Microcalos tolerantes ao álcool alílico foram selecionados durante aproximadamente 30 gerações. As linhagens de células assim obtidas foram testadas quanto a estabilidade da tolerância e das propriedades físico-químicas da enzima.

Os somaclones mantiveram-se tolerantes ao álcool alílico, quando testados nas concentrações de 35, 40 e 45 μM , apresentando I_{50} acima de 37,5 μM .

A atividade específica a ADH dos somaclones variou de 3,48 $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 17,61 $\text{U}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, o que representa cerca de 2,5 a 12,7 vezes menor do que o controle. Assim a tolerância dos somaclones ao agente seletivo, deveu-se a diminuição na atividade da ADH.

A presença de inibidores da ADH nos somaclones foi excluída pela ausência de redução da atividade final, quando extratos dos somaclones foram misturados aos extratos controle, na proporção de 1:1 (v/v).

Estudos de comparação dos K_{ms} foram realizados, considerando as mesmas condições de extração e meio de reação para ADH. Os valores das constantes cinéticas, bem como os valores dos desvios padrões calculados não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o controle, demonstrando, assim, a integridade do sítio ativo da enzima.

O mRNA poli(A)⁺ específico da ADH foi extraído e analisado através de "Northern Blotting". Os resultados mostraram que o mRNA poli(A)⁺ dos somaclones apresentaram o mesmo tamanho do controle. As análises densitométricas dos resultados do "Northern blotting" indicaram redução de até 49,46% da quantidade do transcrito.

O DNA genômico extraído dos somaclones foi digerido com enzimas de restrição. A digestão com a enzima Hind III gerou fragmentos correspondente a aproximadamente 80% do gene Adh1 e a enzima Eco RI gerou fragmentos de 4,1 Kb contendo o gene Adh1 completo e suas regiões adjacentes. Os resultados de "Southern Blotting" não revelaram alterações de tamanho do gene que indicasse adição ou deleção de fragmentos dentro ou fora do gene. Essas alterações poderiam ser originárias da inserção de elemento de transposição

ativado durante a cultura *in vitro*, ou adição/deleção de fragmento devido a quebra cromossômica durante o ciclo celular.

Assim, os soma clones foram caracterizados por apresentarem diminuição da atividade da ADH, sem que houvesse alterações das propriedades físico-químicas da enzima. A redução da expressão gênica pode ter ocorrido devido a substituição ou adição/deleção de uma ou poucas bases na região de regulação do gene *Adh1*. Essas pequenas alterações ocorreram devido as condições estressantes que as células foram submetidas ao longo das gerações em cultura *in vitro*.

ABSTRACT

By using the genic system of alcohol dehydrogenase in maize as a model some aspects related to the origin and nature of somaclonal variation in maize tissue culture were analysed.

Several ADH-deficient somaclones were obtained and characterized at a biochemical and molecular level. In order to obtain those somaclones, alyl alcohol was used as a selective agent in maize cell culture. Alyl alcohol is oxidated when added to culture medium, turning to acrolein and causing normal cells' death. Cells not having ADH activity don't transform alyl alcohol in acrolein, thus they are not affected. A 50% reduction in maize microcali growth was noticed when they were cultured in presence of 32.5 μM alyl alcohol. Microcali tolerant to alyl alcohol were selected during about 30 generations.

So-obtained somaclones were tested as to tolerance stability and enzyme physical-chemical properties. Somaclones kept tolerance to alyl alcohol when tested in 35, 40 and 45 μM concentrations, showing I_{50} above 37,5 μM .

ADH specific ativity of somaclones ranged from 3.48 $\text{U}\cdot\text{ug}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ to 17.61 $\text{U}\cdot\text{ug}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, this representing about 2.5 to 12.7 times beyond the control. So, somaclones tolerance to selective agent were due to ADH activity decrease.

The presence of ADH inhibitor in somaclones was excluded through the lack of final activity reduction, when somaclones extracts were mixed to control extract at a 1:1 (v:v) rate.

The study of K_{ms} comparison was accomplished considering the same extraction conditions and ADH reaction medium.

The values of cinetic constants, as well the standard deviations didn't present meaningful differences when compared to the control, thus showing enzyme active site integrity.

ADH specific mRNA poli(A)⁺ of somaclones presented the same length as that of control. Densitometric analysis of "Northern blotting" results showed a reduction of up to 49.46% of transcript.

The genomic DNA extracted from somaclones was digested with restriction enzyme. Hind III enzyme produced fragments corresponding to approximately 80% Adh1 gene and Eco RI enzyme produced 4,1 Kb fragments having the whole Adh1 gene and its adjacent regions. "Southern blotting" results didn't show changes in gene length indicating fragment addition or deletion in or out the gene.

These changes could have a origin either from transposition elements activated during *in vitro* culture or from fragment addition/deletion due to chromosom breakage during cellular cycle.

Somaclones were characterized in this way due to the fact that they showed activity decrease there not being changes in physical-chemical properties of enzyme. Reduction of genic expression may have occurred due to the replacement or addition/deletion of one or few bases in Adh1 gene regulation region. These small changes happened due to stress conditions which cells were submitted to throughout *in vitro* culture generations.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahloowalia, B.S. & Sherington, J. (1985). Transmission of somaclonal variation in wheat. Euphytica 34:525-537.

Alleman, M. & Freeling, M. (1983). Preliminary characterization of a derivative allele of an unstable regulatory mutant at ADH1. Maize Genet. Coop. News. 57:156-157.

Armstrong, C.L. & Green, C.E. (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164:207-214.

Ashmore, S.E. & Gould, A.R. (1981). Karyotype evolution in a tumour derived plant tissue culture analysed by Giemsa C-banding. Protoplasma 106:297-308.

Bennetzen, J.L.; Swanson, J.; Taylor, W.C. & Freling, M. (1984). DNA insertion in the first intron of maize ADH1 affects message levels: Cloning of progenitor and mutant ADH1 alleles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4125-4128.

Benzion, G.; Phillips, R.L. & Rines, H.W. (1986). Cases histories of genetic variability *in vitro*. In: Vasil, I.K. (ed.). Plant Regeneration and Genetic Variability. Academic Press, Orlando, Florida.

- Birchler, J.A. (1980). The cytogenetic localization of the alcohol dehydrogenase - 1 locus in maize. Genetics 94: 689-700.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7:1513.
- Bonner, T.I.; Brenner, D.T.; Neufeld, B.R. & Britten, R.J. (1973). J. Mol. Biol. 81:123.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Brahic, M. & Haase, A.T. (1978). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplex at high concentrations of formamide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:6125.
- Brettel, R.I.S.; Dennis, E.S.; Scowcroft, W.R. & Peacock, W.J. (1986). Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Mol. Gen. Genet. 202:235-239.
- Britten, R.I. & Kohne, D.E. (1966). Year Book Carnegie Inst. Washinton 65:78.
- Cardy, B.J.; Stuber, C.W.; Wendel, J.F. & Goodamn, M.M. (1983). Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.). North Carolina State University. Raleigh, North Carolina. 1-35.
- Chu, C.C., Wang, C.G., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C. & Chu, C.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. Sci.Sin. 16:659-688.
- Cox, K.H.; Leon, D.V.; Angerer, L.M. & Angerer, R.C. (1983). The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. Methods Enzymol. 121:113-120.

- D'Amato, F. (1978). Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. Frontiers of Plant Tissue Culture. Thorge, M.A. (ed.). IAPTC/University of Calgary, Calgary pp.
- D'Amato, F. (1986). Spontaneous mutation and somaclonal variation. In: Nuclear Techniques and in Vitro Culture for Plant Improvement. Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement. International Atomic Energy Agency, Vienna pp. 3-9.
- Dennis, E.S.; Gerlach, W.L.; Pryor, A.L.; Bennetzen, J.L.; Inglis, A.; Llewellyn, D.; Sachs, M.M.; Ferl, R.L. & Peacock, W.J. (1984). Molecular analysis of alcohol dehydrogenase (Adh1) gene of maize. Nucleic Acids Research 12:3983-3987.
- Dennis, E.S.; Gerlach, W.L.; Peacock, W.J. & Schwartz, D. (1986). Excision of the Ds controlling element from the Adh1 gene of maize. Maydica XXXI. 47-57.
- Döring, H-P.; Freeland, M.; Hake, S.; Johns, M.A.; Kunze, R.; Merckelbach, A.; Salamini, F. & Starlinger, P. (1984). A Ds-mutation of the Adh1 gene in *Zea mays* L.. Mol. Gen. Genet. 193:199-204.
- Dretzen, G., Bellard, M., Corsi, P.S. & Chambon, P. (1981). A relative method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Analytical Biochemistry 112:295-298.
- Efron, Y. & Schwartz, D. (1968). In vivo inactivation of maize alcohol dehydrogenase by a two-factor system. Genetics 61:586-591.
- Evola, S.V.; Burr, F.A. & Burr, B. (1984). 11th Ann. Aharon Katzirkachalsky Conf. Jerusalem (Abstr.).
- Evola, S.V.; Tuttle, A.; Burr, F. & Burr, B. (1985). First Int. Congr. Plant. Mol. Biol. Savannah (Abstr.).

- Fourney, R.M.; Miyakoshi, J.; Day III, R.S. & Paterson, M.C. (1988). Northern Blotting: efficient RNA satining and transfer. Focus 10:5-7.
- Freeling, M. (1973). Simultaneous induction by anaerobiosis or 2,4D of multiple enzymes expression in maize. Molec. Gen. Genet. 127:215-227.
- Freeling, M. (1984). Plant transposable elements and insertion sequences. Ann. Rev. Plant. Physiol. 35:277-2798.
- Freeling, M. & Schwartz, D. (1973). Genetic relationships between the multiple alcohol dehydrogenases of maize. Biochemical Genetics. 8(1):27-36.
- Freeling, M. & Cheng, D.S.K. (1978). Radiation-induced alcohol dehydrogenase mutants in maize following allyl alcohol seiection of pollen. Genet. Res. Camb. 31:107-129.
- Freeling, M. & Bennett, D.C. (1985). Maize Adh1. Ann. Rev. Genet. 19:297-323.
- Fukuda, H. & Komamine, A. (1985). Cytodifferentiation. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. (I.K. Vasil ed.). vol. 2. Academic Press, New York pp. 150-212.
- Gorman, M.B. & Peterson, P.A. (1978). The interaction of controlling element components in tissue culture susem. Maydica 23:173-177.
- Gracen, V.E. & Earle, E.D. (1985). Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue cultures. Twenty-First Annual Meeting of Illinois Corn Breeders School, March 5,6. University of Illinois, USA.
- Groose, R. & Bingham, E.T. (1986). An unstable anthocyanin mutation recovered from tissue culture of alfafa (*Medicago sativa*). Plant Cell Report 5:108-110.
- Hageman, R.H. & Flesher, D. (1960). The effect of anaerobic environment on the activity of alcohol dehydrogenase and other enzymes of corn seedlings. Arch. Biochem. Biophys. 87:203-209.

- Heinz, D.J. & Mee, G.W.P. (1971). Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species-hybrid clones derived from callus tissue. Am. J. Bot. 58:257-262.
- Helling, R.B.; Goodman, H.M & Boyer, H.W. (1974). Analysis of R.Eco RI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. Virology 14:1235.
- Jacobs, M.; Negrutin, I.; Cammaerts, D.; Cattoir-Reynaerts, A.; Dirks, R.; Dolferus, R. & Famelaer, Y. (1985). Strategies to select biochemical mutants with potential use in genetic manipulation of plants. Plant Genetic 685-700.
- Johns, M.A.; Alleman, M. & Freeling, M. (1983). Differential regulation of the Adh1 gene in maize. In: Genetic Engineering of Plants. (Losuge, T.; Meredith, A.P. & Hollaender, A. ed.). Plenum Publishing Corporation.
- Kessler, C. & Holtke, H.J. (1986). Use of restriction enzymes. Gene 33:1
- Lai, Y-K. & Scandalios, (1977). Differential expression of alcohol dehydrogenase and its regulation by endogenous ADH-specific inhibitor during maize development. Differentiation 9:111-118.
- Lai, Y-K. & Scandalios, J.G. (1982). Purification and characterization of an endogenous inhibitor of alcohol dehydrogenase from maize root. Plant Science Letters 27:7-20.
- Larkin, P.J. & Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- Larkin, P.J.; Bretell, R.I.S.; Ryan, S.S.A.; Davis, P.A.; Pallota, M.A. & Scowcroft, W.R. (1985). Somaclonal variation: Impact on plant biology and breeding strategies. In: Biotechnology in Plant Science. Zaithin, M. et al. (eds.). Academic Press, N.Y. pp 83-101.

- Lee, M. & Phillips, R.L. (1987). Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture. Genome 29:122-128.
- Lee, M. & Phillips, R.L. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 39:413-437.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Masterson, R.V.; Biagi, K.; Wheeler, J.G.; Stadler, J. & Morris, D.W. (1988). An embryogenic all line of maize from A188 (Minnesota) contains Mu1-like elements. Plant Molecular Biology 10:273-279.
- McClintock, B. (1950). The origin and behaviour of mutable loci in maize. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 36:344-355.
- McClintock, B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. Science 226:792-801.
- McCoy, T.J.; Phillips, R.L. & Rines, H.W. (1982). Cytogenetic analysis of plant regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures. High frequency of partial chromosome loss. Can. J. Genet. Cytol. 24:37-50.
- Megnet, R. (1967). Mutants partially deficient in alcohol dehydrogenase in *Schizosaccharomyces pombe*. Arch. Biophys. 121:194-201.
- Merckelbach, A.; Döring, H-P & Starlinger, P. (1986). The aberrant Ds element in the Adh1-2F11:Ds allele. Maydica XXXI:119-122.
- Mottinger, J.P.; Dellaporta, S.L. & Keller, P.B. (1984). Stable and unstable mutations in aberrant ratio stocks of maize. Genetics 106:751-755.
- Peacock, W.J.; Dennis, E.S.; Gerlach, W.L.; Llewellyn, D.; Lörz, L.; Pryor, A.L.; Sachs, M.M.; Schwartz, D. & Sutton, W.D. (1983). Gene transfer in maize: Controlling elements and the alcohol dehydrogenase genes. Advances in

Gene Technology: Molecular Genetics of Plant and Animals. Proc. Miami Winter Symp. Downey, K.V. (ed.). Academic Press, Inc. 311-325.

Peschke, V.M.; Phillips, R.L. & Gengembach, B.G. (1987). Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. Science 238:804-807.

Planckaert, F. & Walbot, V. (1989). Molecular and Genetic characterization of Mu transposable elements in *Zea mays*: Behavior in callus culture and regenerated plants. Genetics 123:5676-578.

Rivin, C.J., Zimmer, E.A. & Walbot, V. (1982). Isolation of DNA and Recombinants from maize. In: Maize for Biological Research. Plant Molecular Biology Association, Charlottesville, VA.

Schwartz, D. (1966). The genetic control of alcohol dehydrogenase in maize: gene duplication and repression. Proc. Nat. Acad. Sci USA 56:1431-1436.

Schwartz, D. (1969). An example of gene fixation resulting from selective advantage in suboptimal conditions. Am. Nat. 103:479-481.

Schwartz, D. & Endo, T. (1966). The genetic control of alcohol dehydrogenase polymorphisms in maize. Simple and compound loci. Genetics 53:709-713.

Schwartz, D. & Osterman, J. (1976). A pollen selection for alcohol dehydrogenase negative mutants in plants. Genetics 83:63-65.

Sedmark, J.J. & Grossberg, S.E. (1977). A rapid, sensitive and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. Analytical Biochemistry 79:544-552.

Siegel, L.I. & Bresnick, E. (1986). Northern hybridization analysis of RNA using diethylpyrcarbonate-treated nonfat milk. Analytical Biochemistry 159:82-87.

- Sofer, W-H. & Hatkoff, M.A. (1972). Chemical selection of alcohol dehydrogenase negative mutants in *Drosophila*. Genetics 72:545-549.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503.
- Steel, G.D. & Torrie, J.U. (1980). Principles and procedures of statistics approach. McGraw-Hill Book Company. New York, USA.
- Stromer, J.N.; Hake, S.; Bennetzen, J.; Taylor, W.C. & Freeling, M. (1982). Regulatory mutants of maize Adh1 gene caused by DNA insertions. Nature 300:542-544.
- Sutton, W.D.; Gerlach, W.L.; Schwartz, D. & Peacock, W.J. (1984). Molecular analysis of Ds controlling element mutations at the Adh1 locus of maize. Science 223:1265-1268.
- Widholm, J.M. & Kishinami, I. (1988). Allyl alcohol selection for lower alcohol dehydrogenase activity in *Nicotiana plumbaginifolia* cultured cells. Plant Physiol. 86:266-269.
- Wilkinson, G.N. (1961). Statistical estimation in enzyme kinetics. Biochem. J. 80:324-332.