

BC/29182
IB/81331

T/UNICAMP

T842_c

81322

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Caracterização Molecular de um Mutante para o
Gene *Adh-1* identificado em um Variante
Somaclonal de Milho.

este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Silvia Regina Turcinelli
SR
e aprovada pela Comissão Julgadora.
6/2/96

SILVIA REGINA TURCINELLI

Orientador - Prof. Dr. Adilson Leite

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

T842c Turcinelli, Silvia Regina
Caracterização molecular de um mutante para o gene Adh-1 identificado em um variante somaclonal de milho / Silvia Regina Turcinelli. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Adilson Leite.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Variação (Biologia) 2. Cromossomos-Aberrações.
3. Tecidos (Anatomia e fisiologia) - Cultura e meios de cultura. 4. DNA recombinante. I. Leite, Adilson.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

ANDRÉ E CLÉLIA.

Vocês se lembram quando me levaram ao primeiro dia de aula, soltaram da minha mão dizendo:

Agora vai Silvinha, a Vida te espera....

Eu me apavorei. Hoje eu sei que vocês ficaram olhando de longe, escondidos, me protegendo.

Um grande passo foi dado, a primeira de uma série de etapas foi cumprida.

Eu sei também que tudo isto está somente começando.

Minha eterna gratidão por eu saber e sentir que vocês ainda continuam olhando de longe e principalmente me protegendo.

Esse trabalho não é meu.

É todo todo de Vocês.

Parabéns aos dois.

AMO VOCÊS MUITO...

Silvinha.

À pequenina *Nathália*, meu Anjinho de Guarda favorito, que apesar de sua tão pouca idade, mostrou à todos que vale a pena tentar, com muita força de vontade, sempre...

Ao meu irmão *Carlos André*, meu melhor amigo, sempre, por me ajudar em tudo, de todas as maneiras, mas principalmente com todo o seu carinho, fez com que eu sempre tivesse a certeza de estar protegida e jamais sozinha.

AGRADECIMENTOS.

Ao Prof. Dr. *Adilson Leite*, pela orientação, por minha formação acadêmica, mas principalmente pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. *Paulo Arruda*, por ter me aceito como parte integrante do grupo de trabalho sob sua coordenação no Laboratório de Biologia Molecular e Genética de Plantas.

À Profa. Dra. *Laura M.M. Ottoboni*, à Profa. Dra. *Maricilda P. Mello*, à Profa. Dra. *Anete P. de Souza*, por terem aceito participar da Banca Examinadora de meu Exame de Qualificação, por suas valiosas sugestões e principalmente por me fazerem acreditar mais em minha própria didática.

Ao Prof. Dr. *Rolf Dieter Illg*, à Profa. Dra. *Laudenir Maria Priolli*, à Profa. Dra. *Maricilda Palandi Mello* e à Profa. Dra. *Ana Beatriz Garcia* por terem aceito participar da Banca Examinadora deste Trabalho de Tese, por suas valiosas críticas e sugestões.

Ao grupo do Laboratório de Genética de Microrganismos, coordenado pela Profa. Dra. *Yoko B. Rosato*: *Geórgia, Susi, Regina, Sandra, Edmilson, Liriam, Valéria, Valéria Maia, Wilson e Sandra*, pela amizade e companheirismo.

Ao grupo do Laboratório de Genética Animal, coordenado pela Profa. Dra. *Ana Maria A. Spin*: *Maria Elena, Nair e Rosângela*, minhas amigas, principalmente fora do Laboratório, por nossa alegre convivência durante todos esses anos.

Ao Grupo do Laboratório de Genética Molecular de Plantas, coordenado pela Profa. Dra. *Anete Pereira de Souza*: *Maria do Carmo, Sibov, Luciana*, pelo companheirismo e amizade.

Ao grupo do Laboratório de Genética Humana, coordenado pela Profa. Dra. *Solange Farah*: *Madá, Edi, Marcela, Mara, Isa, Maricilda, Lee, Lisandra, a internacional Janete (que time!!)*, pela amizade, pelas saídas após dias exaustivos, pelas boas risadas e horas nos bares e bailes da vida.

Aos queridos amigos *Rachel e Luzinho*, por todos os bons momentos que tivemos juntos fora do Laboratório.

À querida e graciosa *Berenice Rosa*, por toda a sua ajuda com os experimentos de Gel de Sequenciamento, mas principalmente, por ter se tornado uma grande e especial amiga em momentos difíceis.

Ao amigo *Márcio*, pela ajuda sempre que precisei, pelas dicas do nosso querido Somaclone S1587, mas também pela valiosa amizade.

Ao querido e insubstituível *Pedro Maurício*, pela grande ajuda em todo o preparo do material, mas sem dúvidas pela amizade, carinho e respeito com que sempre me tratou.

Ao grande amigo *Marcelo Menossi*, que mesmo tendo acabado de chegar em nosso Laboratório, renovou nossa Amizade e todos os dias além de um generoso “Bom Dia” vem me oferecer sua ajuda.

Ao Srs. *Chico, Manuel, João*, pela colaboração na manutenção do Laboratório e por toda a atenção.

Ao pessoal da Secretaria do CBMEG: *Tânia, Sandrinha, Cláudia e Ronaldo*, pelo apoio e principalmente pelo carinho.

Ao pessoal da “ Casa dos Meninos ”: *Guilherme, Eduardo, Luzão, Nancy, Ana e Fagoni*, por me acolherem sempre com o maior carinho, me fazendo sentir segura e muito a vontade, como se eu estivesse em minha própria casa, sempre que as coisas se tornavam um pouco complicadas.

Aos " Anjos do Laboratório ".

... Pessoas muito especiais que compartilharam comigo momentos difíceis e por muitas vezes tristes da minha vida e sempre estiveram ao meu lado, sorrindo...

Meu irmãozinho *André Luiz*, por ser sempre o meu fiel escudeiro, por seu bom humor, pelo socorro nos micros e por me tratar sempre com tanto carinho.

Meu irmãozinho *Fernando (Fefelindo)* por toda a sua paciência, bom senso e principalmente por seu jeito doce e carinhoso de ser com todos.

Meu irmãozinho *Felipe*, também pelo socorro nos micros, por todas as suas estórias engraçadas, pelos sustos, pelas horas e horas no H.C., mas principalmente por todo o carinho e a valiosa amizade.

Andrés, Chico (Chiquinho de Jesus) e Germano, por me mostrarem que o Grupo de Oração pode ser sempre a melhor saída para tudo.

Ricardo Dante, pelo imenso carinho, por mais esta doce amizade, por sua atenção a qualquer momento, e por que não dizer, por todos os Churrascos.

Pequena e linda *Marília*, pelas doces palavras de carinho, tornando o nosso dia a dia mais suave e tranquilo.

Teresa Novo e Teresa Caldeira pelas conversas, pelas trocas de receitas e principalmente pela amizade.

Grande Edson, por ter se tornado meu Grande Amigo, fora do Laboratório e por me carregar, literalmente, sempre junto com todo mundo.

Poderosa Marymar, por tudo, pelos conselhos, pelos puxões de orelha, pelo carinho, e principalmente pelo generoso sorriso sempre em todas as manhãs.

Grande Cláudia (Kcal), por ter trazido sua doce mineirice à Campinas e ter compartilhado comigo sempre momentos muito engraçados. Ganhei mais uma grande amiga.

Internacional Ana Beatriz (Bia com muita saudade...), por tudo, pelas crises, por momentos tristes, pelos choros, risos e sorrisos, pelo inesquecível Revellion, pela acolhida em sua nova casa com o coração aberto e por acreditar em mim sempre...

Edson Araújo, pelas palavras de carinho na hora certa, por seu doce violão, por fazer da minha casa a sua casa quando estive em Campinas e por mostrar-me, mesmo à distância, o real significado da palavra *Amizade*.

Querido Gonçalo, por enxugar minhas lágrimas, por me estender sua mão, por jamais permitir que eu pensasse em desistir, por me ensinar que não se deve ter medo de absolutamente nada nesta vida e principalmente por estar sempre ao meu lado.

De Coração....

Muito Obrigada.

.Minha Eterna Gratidão...

À minha irmãzinha do coração *Ana Cristina*, irmã que Deus me deu de presente já adulta. Por tudo, pelas broncas, pelas brigas, por nossos risos e sorrisos, por nossas lágrimas, por ter transformado nossa amizade em um “ porto seguro ” a qualquer hora, e principalmente por me ensinar a acreditar mais em mim mesma.

À minha irmãzinha *Josiane (nossa quanto tempo!)* e o grande *Furlan* por todos os momentos compartilhados juntos, principalmente os mais difíceis e tristes. Pela certeza de que esta amizade não terminará jamais.

Aos eternos amigos *Jhonny e Isamara* por sua presença constante em minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis em que ficaram à frente de meus problemas e tomaram as minhas dores. Eu jamais vou esquecer.

À toda “ *Torcida Familiar* ”, em especial aos doces avós e avôs que sempre se fizeram presentes em minha vida, da maneira mais terna e carinhosa que eu conheço... *Através das Orações...*

À Deus, por toda a sua generosa Misericórdia.

... Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que eu tivesse o Dom da Profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse Amor, nada seria.

E ainda que distribuisse toda a minha fortuna para o sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse Amor, nada disso me aproveitaria.

O Amor é sofredor, é benigno, o Amor não é invejoso, o Amor não trata com leviandade, não ensoberbece.

*Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal.
Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade.*

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O Amor nunca falha, mas havendo profecias, serão aniquiladas, havendo línguas, cessarão, havendo ciência, desaparecerá.

Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos.

Mas, quando vier O QUE é perfeito, então o que é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, discorria como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino.

Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face, agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o Amor...

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	20
MATERIAIS E MÉTODOS	21
Material Vegetal.	21
Seleção de Plantas <i>Adh-0</i> .	21
Determinação Quantitativa da Atividade de ADH.	22
Teste de Atividade de ADH em Grãos de Pólen.	23
Linhagens de Bactérias.	24
Plasmídeos.	25
Isolamento de DNA de Plantas.	26
Isolamento de DNA de Plasmídeos em Larga Escala.	28
Minipreparação de DNA de Plasmídeos.	31
Preparação de Bacteriófago Lambda em Grande Escala.	32
Minipreparação de DNA de Bacteriófago Lambda.	35
Purificação de Fragmentos de DNA a partir de Géis de Agarose utilizando-se Papel DEAE.	37
Construção da Biblioteca Genômica.	38
Transferência de Fragmentos de Restrição “Southern blot”.	39
Marcação de Sondas de DNA utilizando-se o Kit Mega prime Labelling Systems.	41
Marcação e Hibridação com Sondas Não Radioativas.	46
Reações de Sequenciamento de Plasmídeos Dupla Fita.	50
Deleção Unidirecional com Exonuclease III.	53

Metodologia Básica.	56
Soluções Estoques.	56
RESULTADOS	60
Avaliação de Ocorrência de Polimorfismo de Restrição entre o Somaclone S1587 e a Linhagem Cat-100-6.	60
Seleção de Plantas <i>Adh-0</i> .	61
Análise Molecular da Segregação do Alelo <i>adh-0</i> através de Southern blot.	67
Isolamento do Alelo <i>adh-0</i> .	70
Caracterização do Clone Adh1-5.1.	71
Caracterização do Clone Adh1-7.2.	71
DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES	85
SUMÁRIO	86
SUMMARY	89
LITERATURA CITADA	91
APÊNDICE I	110
APÊNDICE II	112

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01 - Vista panorâmica do Campo, com destaque para a Planta S1587.	18
Figura 02 - Exemplos de Mutantes da Planta S1587.	19
Figura 03 - Reação de Oxidação do álcool alílico catalisada pela ADH.	22
Figura 04 - Diagrama esquemático do Plasmídeo pH 2.3 no Gene <i>Adh1-F</i> .	26
Figura 05 - Análise, através de Southern blot, de DNAs Genômicos de Cat-100-6 e S1587.	62
Figura 06 - Espigas da Geração R2 do Somaclone S1587, após tratamento com Álcool Alílico.	63
Figura 07 - Dot blot para Monitoramento da Atividade de ADH.	64
Figura 08 - Análise de Atividade ADH em Grãos de Pólen.	65
Figura 09 - Southern blot comparativo de DNAs das Linhas 62, 65 e 67, digeridos com a Enzima de Restrição Eco RI.	68
Figura 10 - Southern blot comparativo de DNAs das Linhas 62, 65 e 67, digeridos com a Enzima de Restrição Hind III.	69
Figura 11 - Análise de Restrição do Clone Genômico <i>Adh1-5.1</i> .	72
Figura 12 - Mapas de Restrição do Clone Genômico <i>Adh1-5.1</i> e <i>Adh-1F</i> .	73
Figura 13 - Análise de Restrição do Clone Genômico <i>Adh1-7.2</i> .	75
Figura 14 - Representação Esquemática do Subclone pBE 7.2 E.	76
Figura 15 - Alinhamento de Sequências entre o Subclone pBE 7.2 E e a Região Distal da Sequência 5' não Codificadora do Gene ZMPMS2.	78
Figura 16 - Alinhamento de Sequências entre o Subclone pBE 7.2 E e a Região Distal da Sequência 5' não Codificadora do Gene MZEALPTUB.	79
Figura 17 - Mapa de Restrição do Bacteriófago λ Dash.	112
Tabela I - Análise de Atividade de ADH em Plantas individuais da Geração R5 do S1587.	66

ABREVIACOES

ADH	Álcool desidrogenase	pb	Pares de Base
ATP	Adenosina 5' Trifosfato	PEG	Polietileno glicol
DAP	Dias após a polinização	pfu	Unidade Formadora de Placa de Lise
DDBJ	DNA Data Bank of Japan	p/v	Relação Peso/Volume
DO₆₀₀	Absorbância a 600 _{nm}	qsp	Quantidade suficiente para
DTT	Ditiotreitol	rpm	Rotações por Minuto
2-ME	2 - mercapto-etanol	SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
EMBL	European Molecular Biology Laboratories	Tris	Tris (Hidroximetil) Aminometano
EDTA	Ácido Etileno diaminotetracético	v/v	Relação Volume/Volume
GenBank	Genetic Sequence Data Bank	X g	Força Centrifuga em relação à Aceleração Gravitacional
HEPES	Ácido N-2-Hidroxi-etil-piperazina N-2-Etanosulfônico		
IPTG	Isopropil tio β-D-Galactosídeo		
Kb	Kilobase		
KDa	KiloDalton		
MOPS	[3 - (N - Morfolino)Ácido Propanosulfônico]		

INTRODUÇÃO

VARIAÇÃO SOMACLONAL

A cultura de tecidos de plantas envolve a proliferação de células não diferenciadas por várias gerações em condições de cultivo bem definidas e, em geral, a subsequente regeneração de plantas. As plantas obtidas a partir de cultura de tecidos, deveriam, teoricamente, apresentar o mesmo genótipo da planta parental. Durante o cultivo celular a proliferação ocorre exclusivamente através de mitose.

Desta forma, os ciclos de cultivo são utilizados na clonagem de um determinado genótipo, podendo ser utilizados como um método de propagação assexuada. Entretanto plantas regeneradas, a partir de culturas de tecidos, frequentemente apresentam variações fenotípicas. Estas variações foram consideradas, inicialmente, como artefatos de cultivo, alterações epigênicas provavelmente resultantes da exposição a fitohormônios exógenos (Larkin & Scowcroft, 1981).

Sabe-se, no entanto, que um grande número de variações fenotípicas encontradas resultam de alterações gênicas, sendo portanto transmissíveis. Esta constatação determinou a descoberta de uma nova fonte de variabilidade genética (Larkin & Scowcroft, 1981).

O aperfeiçoamento das técnicas de cultura de tecidos e, por consequência, da regeneração de plantas, foi de fundamental importância para se constatar o caráter generalizado da variação genética e citogenética apresentada pelas células expostas ao cultivo *in vitro*.

O termo "*Variação Somaclonal*" foi criado por Larkin e Scowcroft em 1981 para representar a variação genética apresentada por plantas regeneradas. Tendo em vista este novo termo, originou-se também o termo "*Somaclone*", o qual foi proposto para designar os variantes originários de qualquer forma de cultura de células.

De acordo com Larkin (1987), o primeiro registro desta variabilidade foi descrito em cana-de-açúcar por Heinz & Mee (1971), e posteriormente em outras espécies de plantas, tais como: arroz, milho, alfafa, tomate e centeio entre outras (Larkin & Scowcroft, 1981; Larkin, 1987, Evans, 1989, De Klerk, 1990).

A principal diferença entre variação somaclonal e a variação epigênica diz respeito a hereditariedade das variações. As variações somaclonais podem ser transmitidas através da meiose, sendo portando herdáveis, o mesmo não acontecendo com as variações epigênicas. As variações epigênicas podem ser descritas como uma resposta fisiológica do tecido. Assim sendo, as variações epigênicas são consideradas reversíveis e prognosticáveis (De Klerk, 1990).

Por outro lado, segundo Holliday (1987), as diferenças relatadas entre a variação somaclonal e a variação epigênica não se apresentam fortemente delimitadas, podendo ser consideradas como um gradiente de diferentes níveis de variação. Este autor cita como exemplo a metilação do DNA, que apesar de poder ser transmitida através de meiose, trata-se de uma característica reversível.

Vários fatores relacionados ao aparecimento da variação somaclonal têm sido estudados.

Com relação a natureza do tecido cultivado, estes estudos têm indicado que a frequência desta variação depende do genótipo da planta doadora, enquanto que o tipo de explante parece não afetar profundamente a taxa de variação (Larkin, 1987).

Procedimentos de cultivo que minimizam a duração da fase de *callus* parecem estar relacionados com a diminuição da taxa desta mesma variação (Orton, 1985; Larkin, 1987; Armstrong & Phillips, 1988; Hartmann *et al.*, 1989).

Existem ainda poucos dados a respeito do efeito dos componentes dos meios de cultura, sendo que os mais comumente relatados correspondem aos reguladores de crescimento celular.

Devido a constatação de que altas concentrações das auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido naftalenoacético (NAA) estarem relacionados com aberrações cromossômicas (Bayliss 1980), estes reguladores foram considerados como possíveis agentes mutagênicos, envolvidos na geração de variação somaclonal (George & Sher-

rington, 1984). No entanto, Dolézal & Novak (1984), em um estudo de mutagênicos químicos, demonstraram que a presença do agente mutagênico N-metil-N-nitrosouréia determinava um aumento de 21 vezes na frequência de obtenção de mutantes de cores em estames de *Tradescantia*. Enquanto que, a presença dos reguladores 2,4-D, NAA e benzilaminopurina, em concentrações normalmente utilizadas em meios de cultura, não ocasionaram efeitos mutagênicos.

A nível molecular, sabe-se que as variações somaclonais poderiam apresentar-se como resultado das mais diferentes formas de eventos mutacionais, tais como: mutações de ponto, ativação de sistemas de transposição, alterações em número de cromossomos (poliploidia, aneuploidia), ou ainda estrutura de cromossomos (duplicação, translocação) (Larkin & Scowcroft, 1981; Lee & Phillips, 1988; Phillips *et al.*, 1990).

Dentre as variações genéticas que surgem em resposta à cultura *in vitro*, a melhor documentada diz respeito às aberrações cromossômicas, tais como, alterações do número e da morfologia dos cromossomos.

Alterações em número de cromossomos foram observadas em cultura de tecidos (Mitra *et al.*, 1960), e posteriormente em plantas regeneradas (Sacristán & Melchers, 1969). Revisões sobre este assunto podem ser encontradas em Murashige (1974); Bayliss (1980); Lee & Phillips (1988).

Tem sido observado também que um grande número de plantas regeneradas, mesmo apresentando o número correto de cromossomos, apresenta alterações cromossômicas estruturais (Lee & Phillips, 1988).

Entretanto, a importância das aberrações cromossômicas, como possível fonte de variação somaclonal, tem sido contestada (De Klerk, 1990). Armstrong & Phillips (1988) ao estudar plantas de milho regeneradas não conseguiram encontrar uma correlação significativa entre alterações em número ou estrutura de cromossomos, com alterações fenotípicas.

Associados às aberrações cromossômicas, podemos incluir os processos de rearranjos cromossômicos, com especial ênfase para a recombinação mitótica. Esse processo de recombinação somática foi observado por diversos autores, em

diversas espécies de plantas, e parece estar envolvido com os processos responsáveis pela conversão gênica, descrita em plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos (Lorz & Scowcroft, 1983; Lee & Phillips, 1988; Armstrong & Phillips, 1988; Dennis & Brettell, 1990; Phillips *et al.*, 1990).

Esses rearranjos não se limitam somente aos cromossomos. Podem ocorrer também com DNAs presentes em organelas, tais como, cloroplastos e mitocôndrias (Gengenbach *et al.*, 1977; Brown & Lorz, 1986; Phillips *et al.*, 1990; Peschke & Phillips, 1992).

Lee & Phillips (1988), propuseram dois possíveis mecanismos como sendo responsáveis por rearranjos cromossômicos que ocorrem durante o cultivo celular: O primeiro baseado na replicação tardia da heterocromatina, e o segundo baseado na diminuição dos níveis de nucleotídeos.

1. A replicação tardia das regiões heterocromáticas e pericentroméricas pode desencadear o ciclo quebra-fusão-ponte na anáfase. Além de provocar o aparecimento de aberrações cromossômicas, este processo poderia também resultar na ativação de elementos de

transposição. Segundo estes autores, esta ativação poderia apresentar-se como resultado da transferência de cópias intactas dos transposons para regiões cromossômicas de maior atividade, alterações no estado de metilação, ou como resultado da ação de mecanismos de reparo. Corroboram com esta hipótese, os resultados descritos por Peschke *et al.*, (1987), os quais descreveram a detecção de ativação do elemento de transposição *Activator (Ac)* em plantas de milho regeneradas, a partir de cultura de *callus* embriogênicos de milho.

2. A depleção de desoxirribonucleotídeos pode determinar alterações nas atividades relacionadas ao metabolismo de DNA, incluindo a biossíntese de precursores, replicação, reparo, recombinação e degradação (Weinberg *et al.*, 1981; Kunz, 1982). Os métodos de cultivo de células de plantas requerem a constante transferência de meio de cultura. Assim sendo, durante os intervalos entre as transferências, as concentrações dos nucleotídeos podem alcançar níveis críticos, capazes de desencadear o surgimento de aberrações, tais como, aneuploidia, recombinação

mitótica e transformação oncogênica (Lee & Phillips, 1988).

Com relação a ocorrência de mutações pontuais em somaclones, o exemplo conhecido encontra-se descrito por Brettell *et al.*, (1986), onde estes autores descrevem um variante somaclonal de milho, o qual apresenta um alelo desconhecido do gene *Adh-1*, que foi detectado por apresentar um diferente ponto isoelétrico (pI), quando comparado com alelos presentes na linhagem original. Através do sequenciamento do alelo variante, estes autores demonstraram que a troca de uma única base determinou a substituição de um resíduo de glutamina por valina na proteína ADH-1.

Alterações no estado de metilação do DNA, induzidas durante a cultura *in vitro*, têm também, sido propostas como possíveis alterações moleculares, capazes de promover o aparecimento de variantes somaclonais (Brown & Lorz, 1986; Lo Schiavo *et al.*, 1989, Phillips *et al.*, 1990, Peschke & Phillips, 1992).

Apesar dos altos níveis de metilação das citosinas, normalmente presentes nas sequências CG ou CNG em plantas (Gruenbaum *et al.*, 1981), pouco se sabe ainda a respeito do papel desempenhado

pelo estado de metilação na expressão gênica.

Estudos realizados com T-DNA (Van Slogteren *et al.*, 1984; Klaas *et al.*, 1989) e genes ribossomais (Watson *et al.*, 1987) têm indicado uma correlação entre a transcrição e a hipometilação. Esta correlação foi também descrita no controle dos genes de proteínas de reserva em milho, que são expressos especificamente no endosperma, durante a maturação das sementes (Bianchi & Viotti, 1988).

Outro mecanismo proposto, como possível causa de variação somaclonal, envolvendo o estado de metilação de DNA, a ser considerado, trata-se da ativação de elementos móveis de transposição. Em milho, a ativação de elementos móveis de transposição como *Ac*, *Spm* e *Mu*, depende da desmetilação de regiões próximas ao início da transcrição do gene codificador das transposases (Dennis & Brettell, 1980; Phillips *et al.*, 1990).

O caráter hereditário da variação somaclonal permite que a mesma possa ser utilizada no processo de seleção *in vitro* de células variantes resistentes à diferentes condições causadoras de *stress*, tais como, a presença de toxinas

fúngicas (Gegenbach *et al.*, 1977; Rines & Luke, 1985), toxinas de insetos (Zemetra *et al.*, 1993), herbicidas (Chaleff, 1983; Nafziger *et al.*, 1984; Donn *et al.*, 1984), e mutantes tolerantes à baixas temperaturas (Lazar *et al.*, 1988).

A cultura de tecidos em plantas tem possibilitado também a seleção celular de variantes genéticas de interesse no estudo de vias metabólicas. No que diz respeito ao estudo das vias metabólicas de aminoácidos, combinações de aminoácidos ou de seus análogos têm sido utilizadas na seleção de mutantes regulatórios em milho (Azevedo *et al.*, 1990, Azevedo & Arruda, 1995).

O estudo da variação somaclonal interessa também aos grupos relacionados à micropropagação de plantas, que pretendem minimizar o máximo possível esta variação. Como exemplo da impor-

tância deste estudo De Klerk (1990) cita a Holanda, um dos maiores produtores mundiais de plantas ornamentais, onde estima-se uma perda superior a 1 milhão de dólares por ano devido a aberrações produzidas, em parte por variações somaclonais, durante a micropropagação.

A cultura de tecidos de plantas tem sido empregada em métodos que envolvem a adição ou modificação de genes, através de técnicas de DNA recombinante (De La Pena *et al.*, 1987; Spencer *et al.*, 1992; Lazzeri & Shewry, 1993; Vasil, 1994).

Desta forma, o estudo da variação somaclonal deve interessar também aos grupos de pesquisadores relacionados com projetos, os quais envolvem a obtenção de plantas transgênicas.

ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS DE TRANSPOSIÇÃO EM MILHO

Os elementos genéticos móveis de transposição, também denominados *Transposons*, foram descritos, em milho, por Barbara McClintock há mais de 40 anos. Baseada em estudos de instabilidade genética McClintock (1950) criou o conceito de entidades herdáveis móveis para os transposons, por ela denominados elementos controladores ("*controlling elements*").

Atualmente encontram-se caracterizados elementos de transposição em diversas espécies dos diferentes reinos dos seres vivos, indicando portanto que estes elementos apresentam-se como componentes naturais da maioria dos genomas (Calos & Miller, 1980; Capy *et al.*, 1994).

Os transposons correspondem a sequências de DNA com capacidade de se deslocar no genoma através dos processos de excisão e inserção ou reintegração. A principal consequência deste deslocamento (transposição), trata-se da indução de mutações, através da integra-

ção em genes ou em regiões próximas, de forma a reduzir ou prevenir sua expressão, produzindo assim fenótipos nulos ou intermediários para uma determinada característica. A inserção de elementos de transposição, em plantas, é comumente instável podendo sofrer um processo de reversão durante o desenvolvimento. Esta instabilidade somática é responsável pelo fenótipo variegado, em geral produzido pela presença de clones de células revertidas em um fundo constituído por células mutadas (Döring & Starlinger, 1986; Nevers *et al.*, 1986; Peterson, 1987; Federoff, 1989a).

Em milho, novos sistemas de transposição são continuamente descobertos, sendo que a caracterização molecular destes sistemas tem sido objeto de um grande número de revisões (Federoff *et al.*, 1983; Döring & Starlinger, 1986; Peterson, 1987; Federoff, 1989a; Gierl *et al.*, 1989; Bennetzen *et al.*, 1993).

Baseados nos mecanismos de transposição, os transposons são classificados em dois grupos distintos:

O primeiro grupo compreende os retrotransposons, os quais se deslocam por intermédio de uma cópia de RNA. Este grupo pode ser ainda subdividido em: **A.** Similares aos retrovírus, os quais apresentam extensas regiões flanqueadoras repetidas. **B.** Dissimilares aos retrovírus, caracterizados por terminações poli(A) de extensões variáveis.

Em milho, o elemento de transposição *Bs1* caracteriza-se por ser um transposon do tipo retrovírus (Johns *et al.*, 1985), enquanto que o elemento de transposição *Cin4* apresenta-se como um exemplo dos transposons dissimilares aos retrovírus (Schwarz-Sommer *et al.*, 1987). Sendo que em ambos os casos foram descritas sequências, as quais apresentavam similaridade com as sequências de transcriptase reversa.

O segundo grupo, compreende os elementos de transposição clássicos, que se deslocam por intermédio de uma excisão e reintegração, diretamente através de sequência de DNA. Estes elementos apresentam regiões terminais repetidas, porém com orientações invertidas. A

maioria dos elementos de transposição de milho caracterizados até o momento pertence a este segundo grupo (Weil & Wessler, 1990).

A maioria dos transposons clássicos de milho apresenta-se em uma das seguintes formas: **A.** Elementos autônomos, os quais são capazes de promover a sua própria transposição. **B.** Elementos não-autônomos, os quais sofrem transposição apenas na presença de outras cópias de elementos autônomos. (Federoff, 1989a).

Os elementos autônomos codificam a enzima Transposase, responsável pela transposição, enquanto que os elementos não-autônomos não a codificam, ou codificam enzimas defectivas incapazes de promover a transposição. Desta forma, a ativação dos elementos não-autônomos torna-se completamente dependente da presença de cópias de elementos capazes de promover complementação (Federoff, 1989a).

Os elementos de transposição de milho foram, inicialmente, divididos em grupos com base em sua capacidade de interagir geneticamente. Posteriormente estes grupos foram designados Famílias,

as quais compreendem elementos estruturalmente relacionados.

Entre as famílias de elementos de transposição, já descritas, em milho, podemos destacar como principais: *Activator-Dissociation (Ac/Ds)*, *Suppressor-Mutator (Spm)* e *Mutator (Mu)*. (Federoff, 1989a; Brettell & Dennis, 1990; Weil & Wessler, 1990; Gierl, 1990).

Os elementos *Ds (Dissociation)* foram originalmente identificados por McClintock (1950) como sítios específicos de quebras cromossômicas ou dissociação. Esta autora descreve ainda que as quebras em *Ds* não ocorriam espontaneamente, requerendo, desta forma, a presença de um outro elemento de transposição denominado de *Activator (Ac)*. Os elementos *Ds*, correspondem portanto, a elementos não autônomos pertencentes ao sistema de transposição *Ac/Ds*.

O elemento de transposição *Ac* foi caracterizado molecularmente através do seu isolamento a partir do locus *waxy*, que codifica, em milho, uma enzima envolvida na biosíntese de amido (Federoff *et al.*, 1983; Müller-Neumann *et al.*, 1984, Pohlman *et al.*, 1984). Este elemento isolado apresentou 4,6 Kb de ex-

tensão, sendo que 11 pares de bases apresentam-se repetidos de forma invertida em suas terminações.

A caracterização molecular de elementos *Ds*, a partir de diversos *loci*, tem demonstrado tratar-se de um grupo heterogêneo de elementos que apresentam uma grande variação estrutural. Alguns destes elementos apresentam-se como sendo deleções do elemento de transposição *Ac*, enquanto que outros apresentam sequências não relacionadas com o elemento de transposição *Ac*, com exceção das terminações repetidas (Doring, *et al.*, 1984; Sutton *et al.*, 1984; Dooner *et al.*, 1985; Merckelbach *et al.*, 1986; Federoff, 1989a).

Os elementos *Ac* e *Ds*, durante o processo de inserção, promovem uma duplicação de 8 pares de base da sequência alvo, sendo que uma parte desta duplicação permanece após a excisão do elemento (Sachs *et al.*, 1983). A formação destas cicatrizes, após a excisão, foi também descrita em estudos de mobilidade destes mesmos elementos quando introduzidos em sistemas heterólogos de plantas, tais como tabaco, *Arabidopsis* e cenoura (Baker *et al.*, 1986; Van Sluys *et al.*, 1987).

Os elementos autônomos *Ac* codificam a enzima Transposase, responsável por sua mobilização, enquanto que os elementos não autônomos *Ds*, apresentam-se defectivos nesta função (Federoff *et al.*, 1983; Dooner *et al.*, 1986; Kunze & Starlinger, 1989). Desta forma, a mobilização dos elementos *Ds* torna-se dependente da complementação desta função pelos elementos autônomos. Este fato foi comprovado através da observação de que elementos *Ac* são capazes de promover sua própria excisão, e de elementos *Ds*, quando introduzidos em tabaco (Baker *et al.*, 1987).

Existem varias evidências indicando o controle genético da frequência, bem como do tempo em que os elementos *Ac* sofrem o processo de transposição. Como exemplo destas evidências, pode-se citar o fato da excisão de elementos *Ac* tornar-se progressivamente mais retardada, quando ocorrer um aumento do número de cópias do elemento por genoma da planta (Federoff, 1989a; Weil & Wessler, 1990).

A reativação de elementos *Ac* inativos tem sido correlacionada com a hipometilação de sítios localizados próximos as regiões 5' destes mesmos elemen-

tos (Schwartz & Dennis, 1986; Chomet *et al.*, 1987).

A família dos elementos *Suppressor-Mutator (Spm)*, apresenta também elementos autônomos e não-autônômos. O elemento autônomo foi designado por Peterson (1953) como *Enhancer (En)*, e o elemento não-autônomo como *Inhibitor (I)*. McClintock (1954) denominou apenas o elemento autônomo como *Spm*. Os elementos não-autônômos desta família foram também denominados de *defective-Spm (dSpm)* (Banks *et al.*, 1985).

A caracterização molecular de elementos *Spm* inseridos em diversos genes, mostra um elevado grau de conservação deste elemento (Pereira *et al.*, 1985; Pereira *et al.*, 1986; Masson & Federoff, 1987). Estes elementos apresentam um tamanho médio de 8,4 Kb, contendo nas extremidades, repetições invertidas de 13 pb flanqueadas por repetições diretas de 3 pb do gene hospedeiro no qual ocorreu a inserção (Schwartz-Sommer *et al.*, 1985; Masson *et al.*, 1987; Wessler & Weil, 1990).

Ao contrário dos elementos não autônomos da família *Ac/Ds*, os elementos *dSpm* apresentam-se como sendo

deleções internas dos elementos autônomos *Spm* (Pereira *et al.*, 1985; Pereira *et al.*, 1986).

A análise genética da interação entre os elementos autônomos *Spm* e alelos defectivos (*dSpm*) que inativam apenas parcialmente a expressão gênica determinou a identificação de duas funções geneticamente distintas em *Spm* (McClintock, 1961). A função *supressor* (*sp*), responsável por suprimir a expressão residual de genes parcialmente inativados, e a função *mutator* (*m*) a qual é requerida para a excisão deste elemento.

As diferentes funções do elemento de transposição *Spm* são responsáveis pelas características herdáveis e reversíveis deste elemento. Este mesmo elemento poderá ser encontrado em diferentes condições, a saber: o elemento *Spm* poderá ser expresso constitutivamente durante o desenvolvimento, poderá apresentar-se geneticamente inativo e sua presença poderá ser detectada somente em casos de reativação induzida, ou ainda o elemento *Spm* poderá ser programado para ser ativo somente em situações específicas durante o desenvolvimento (McClintock, 1961).

Até o momento foi identificada apenas uma única unidade transcricional que ocupa quase toda a extensão do elemento *Spm* (Pereira *et al.*, 1986; Federoff, 1995). No entanto este mRNA pode sofrer diferentes processamentos, sendo que até o momento foram identificados 4 diferentes mRNAs maduros: *tpnA*, *tpnB*, *tpnC* e *tpnD* (Federoff, 1995).

Em estudos realizados em plantas transgênicas de tabaco Masson *et al.*, (1991) demonstraram que apenas os produtos dos genes *tpnA* e *tpnD* são essenciais para a mobilização dos elementos não autônomos *dSpm*.

A proteína TpnA apresenta-se como uma proteína reguladora capaz de promover a ativação de elementos inativados por metilação, bem como reprimir elementos ativos não metilados (Schlappi *et al.*, 1994).

Baseada na capacidade da proteína TpnA de reverter o estado de metilação dos elementos *Spm*, Federoff (1995) sugeriu que o mecanismo molecular de regulação deste mesmo elemento, durante o desenvolvimento da planta, poderia estar relacionado com os sistemas de metilação da planta e a proteína TpnA.

O elemento de transposição *Mutator* (*Mu*) foi identificado por Robertson em 1978. O primeiro elemento deste sistema de transposição a ser caracterizado molecularmente trata-se do elemento *Mu1*, o qual foi isolado de uma inserção no gene *Adh-1*, que codifica a enzima álcool desidrogenase (Bennetzen *et al.*, 1984). O elemento de transposição *Mu1* apresenta 1,3 Kb de extensão, com repetições invertidas de 213 e 215 pb, as quais apresentam aproximadamente 95% de identidade. Este elemento produz ainda duplicações de aproximadamente 9 pb sobre a inserção (Barker *et al.*, 1984).

Outros elementos pertencentes à família do elemento de transposição *Mu*, os quais apresentavam desigualdades em suas sequências internas, foram posteriormente isolados devido a similaridade apresentada em suas regiões terminais invertidas. De acordo com o grau de similaridade apresentado por estes elementos, os mesmos foram classificados em diversas subfamílias (Bennetzen *et al.*, 1993).

Todas as linhagens de milho analisadas contêm sequências similares à sequência de elementos *Mu*, no entanto poucas linhagens exibem o fenótipo *Mu-*

tator (Chandler, 1986). A ausência de atividade destes elementos tem sido correlacionada com modificações em seus DNAs (Chandler & Walbot, 1986; Bennetzen 1987). A grande maioria das linhagens que apresenta atividade *Mutator* apresenta elementos da subfamília *Mu1/Mu2* (Bennetzen *et al.*, 1993).

Até o momento ainda não existem evidências de que estes elementos sejam capazes de codificar uma transposase funcional, indicando portanto tratar-se de elementos não autônomos (Bennetzen *et al.*, 1993).

Os elementos *Mu* estão presentes em 15 a 50 cópias em linhagens ativas, bem como em progênies obtidas através do cruzamento com linhagens inativas (Alleman & Feeling, 1986). Esta observação sugere um mecanismo replicativo de transposição dos elementos *Mu*, diferindo do mecanismo deduzido para as famílias *Ac* e *Spm*, que se deslocam através de mecanismos conservativos não relacionados com replicação (Bennetzen *et al.*, 1993).

A descoberta de que elementos de transposição *Mu* podem existir em forma livre e circular, corrobora com a hipótese do mecanismo replicativo de transposi-

ção destes mesmos elementos (Sundaresan & Freeling, 1987).

Cabe-nos citar ainda a importância dos elementos móveis de transposição de milho como instrumentos para caracterização molecular de genes.

Uma vez isolado um determinado elemento de transposição, este poderia ser utilizado como sonda para clonagem de um outro gene que possa ter sido mutado, através de inserção deste mesmo elemento. Após detectada a mutação neste novo gene, o mesmo poderá ser isolado molecularmente, através de clonagem de sequências flanqueadoras do DNA do elemento de transposição.

Esta técnica denominada "Transposon Tagging", foi utilizada pela primeira vez na caracterização do locus *Bronze* em milho (Federoff *et al.*, 1984). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na caracterização de genes que dificilmente poderiam ser isolados, a partir de bibliotecas de DNA, uma vez que não são conhecidos os produtos destes genes, especialmente aqueles envolvidos em mecanismos, tais como: regulação gênica, desenvolvimento, resistência à patógenos, ou ainda genes relacionados com o controle de diferentes processos fisio-

lógicos e bioquímicos (Gierl & Saedler, 1992; Dellaporta & Moreno, 1994; Osborne & Baker, 1995).

A aplicação da técnica de "transposon tagging" pode ser estendida também à espécies de plantas que não apresentam sistemas de transposição caracterizados. Neste caso, elementos autônomos são introduzidos através de técnicas de transformação (Osborne & Baker, 1995).

Esta técnica associada à facilidade em identificar-se novos mutantes para o caráter de pigmentação conferido pela antocianina em plantas de milho, conduziu diversos autores em empenhar-se no isolamento e caracterização de seis novos alelos, sendo que destes, quatro (*A1*, *Bz1*, *Bz2*, *C2*) codificam enzimas e os outros dois (*C1* e *R*) atuam como ativadores de transcrição (Cone *et al.*, 1986; Paz - Ares *et al.*, 1987; Ludwing *et al.*, 1989).

McCarty *et al.*, (1989) também utilizaram a técnica de "transposon tagging" com o auxílio do elemento de transposição *Mu*, para clonagem do gene *Vp1*, para demonstrar que uma mutação neste gene poderia levar a ausência de antocianina em aleurona e embrião, sen-

do que mutações nos demais genes (*Vp2*, *Vp5*, *Vp7*, *Vp8* e *Vp9*) não causariam alterações, no que concerne ao caráter pigmentação de sementes.

Por outro lado, os genes *Vp2*, *Vp5*, *Vp7* e *Vp9* bloqueiam a biosíntese de carotenóide e como consequência não acumulam ácido abscísico (ABA), o que confere um fenótipo branco ao endosperma, associado à germinação precoce. Desta forma, para explorar as possíveis causas deste mecanismo, este mesmo grupo de pesquisadores utilizou-se da mesma técnica e também do mesmo ele-

mento de transposição *Mu* para clonagem do gene *Vp7*.

A identificação do gene responsável pela mutação *Opaco-2* em milho, também foi realizada com o auxílio da técnica de "transposon tagging", por dois grupos distintos de pesquisadores, os quais utilizaram diferentes elementos móveis de transposição.

Schmidt *et al.*, (1987) utilizaram o elemento de transposição *Suppressor - Mutator - Spm*, enquanto que Motto *et al.*, (1988) utilizaram o elemento de transposição *Activator - Ac*.

GENE *Adh-1* DE MILHO

O gene *Adh-1* codifica a principal enzima com atividade de álcool desidrogenase (ADH) presente nas sementes, plântulas e pólen de milho, porém ausente em folhas maduras.

Adh-1 corresponde a um dos genes melhor estudados em eucariotos. Trata-se de um gene não essencial. Plantas que apresentam mutação neste gene, frequen-

temente apresentam um crescimento normal, exceto em condições de anaerobiose, quando a via conhecida como fermentação alcoólica é ativada.

Quando uma plântula de milho é submetida a anaerobiose, três isoenzimas com atividade ADH são induzidas nas raízes (Schwartz, 1969). As isoenzimas representam a dimerização randômica de

polipeptídios codificados por dois diferentes genes de ADH: *Adh-1* e *Adh-2* (Freeling & Schwartz, 1973). A holoenzima é constituída por um dímero de 80 KDa (Schwartz, 1972).

O efeito da atividade de *Adh-2* na sobrevivência em condições de anaerobiose é mínima, e somente aparente em plantas que não apresentam atividade de ADH (Freeling & Bennett, 1985).

As sequências codificadoras dos dois genes são muito similares, porém o mesmo não acontece com as regiões flanqueadoras 5', que apresentam diferenças provavelmente relacionadas aos diferentes métodos de indução através de hipóxia (Paul & Ferl, 1991).

O locus *Adh-1* foi mapeado próximo ao telômero do cromossomo IL de milho (Birchler, 1980), enquanto que o locus *Adh-2* foi mapeado no cromossomo 4S (Freeling & Birchler, 1985).

No locus *Adh-1* os alelos mais comuns são conhecidos como *Adh-1S* e *Adh-1F*, que codificam respectivamente, polipeptídios que apresentam baixa e alta mobilidade eletroforética (Schwartz & Endo, 1966).

Clones genômicos e de cDNA correspondentes aos dois alelos já encontram-se descritos (Dennis *et al.*, 1984; Dennis *et al.*, 1985; Sachs *et al.*, 1986).

Mutantes *adh-0* de milho resultantes da inserção ou excisão de elementos de transposição têm sido descritos para diferentes famílias de transposons: *Mu* (Stromer *et al.*, 1982; Alleman & Freeling, 1983; Freeling & Bennett, 1985), *Ds* (Peacock *et al.*, 1983; Döring *et al.*, 1984) e *Bs1* (Mottinger *et al.*, 1984). A inserção dos elementos de transposição reduz parcial ou totalmente a expressão do gene *Adh-1* em plantas.

SOMACLONE S1587

A linhagem de milho Cat-100-6 consiste de uma linhagem "flint", a qual foi derivada de uma população Cateto, pertencente ao Banco de Germoplasma de milho do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas.

Esta linhagem caracteriza-se por apresentar alta tolerância ao alumínio (Prioli, 1987) entretanto, possui características indesejáveis, tais como baixa capacidade de combinação, ressecamento precoce da planta, o que por sua vez determina uma redução na granação, e também alta susceptibilidade de suas sementes ao ataque de fungos (Silva, W.J., dados não publicados).

Devido à característica de alta tolerância ao alumínio da linhagem Cat-100-6, em 1985, no Laboratório de Genética Vegetal, deste mesmo Departamento de Genética e Evolução, foram derivados calos embriogênicos que foram mantidos em meio de cultura por seis meses. A partir destas culturas foram regeneradas plantas e estas, por sua vez,

foram transferidas para o campo e autofecundadas ou cruzadas com outras plantas regeneradas, a partir desta ou de outras linhagens.

A maioria das plantas regeneradas apresentou aspectos semelhantes aos da linhagem original Cat-100-6. No entanto, uma das plantas regeneradas apresentou um grande número de alterações em suas características.

Este somaclone apresentou alto vigor, caracterizado por seu tamanho duas a três vezes maior que as demais plantas regeneradas, perfilhamento, e um aumento do número de espigas. O colmo primário produziu quatro espigas, enquanto que o segundo e terceiro perfilhos produziram duas espigas cada um (Fig. 1).

A manutenção das alterações em gerações posteriores permitiu supor que as mesmas poderiam apresentar-se como resultado de variações somaclonais, ocorridas durante o período de cultura. Esta planta foi denominada *Somaclone S1587*.

A análise posterior de progênies originárias desse regenerante revelou a presença de um grande número de mutações em sementes e plântulas (Targon *et al.*, 1991).

Entre as mutações reconhecidas podemos destacar mutantes do tipo vivíparos, mutantes de endosperma dos tipos *opaque e shrunken*, desenvolvimento de plantas braquíticas, plantas anãs e ainda o aparecimento de folhas estriadas (Fig. 2) (Targon *et al.*, 1991).

Várias progênies apresentaram segregação característica de genes mutantes recessivos e dominantes, enquanto que, algumas progênies apresentaram grandes desvios de segregação, e desta forma, um certo grau de instabilidade.



Figura 1: Vista panorâmica do campo experimental mostrando uma série de plantas de milho regeneradas, a partir de calos embriogênicos friáveis (Tipo II), entre as quais destaca-se, pelo seu vigor, a planta S1587.

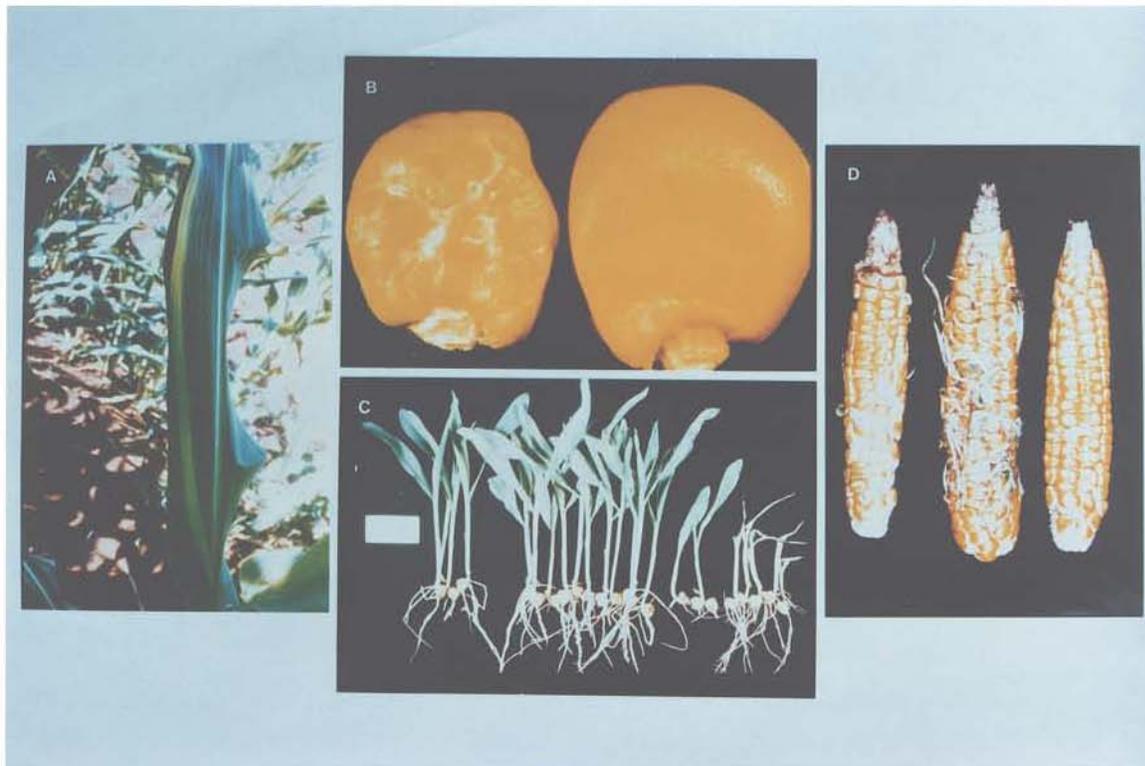


Figura 2: Exemplos de mutantes segregando nas progênies R2 e R3. (A) Folhas Variegadas, (B) Endosperma Variegado, (C) Plântulas Defectivas, (D) Vivíparo.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consistiu na caracterização de um Mutante para o gene *Adh-1* identificado em um Variante Somaclonal de milho (S1587) selecionado no Laboratório de Genética de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas.

Considerando-se como premissas básicas a alta frequência de variantes genéticas observada em progênies do somaclone S1587, e aliado ao seu grau de instabilidade, a hipótese de que a ativação de um elemento de transposição poderia estar envolvida na origem das mutações observadas neste somaclone, as principais abordagens adotadas para a realização deste trabalho foram:

Avaliação de ocorrência de polimorfismo de restrição entre o Somaclone S1587 e a linhagem original Cat-100-6.

Identificação de um mutante para o gene *Adh-1* em progênies do Somaclone S1587, visando procurar por uma possível inserção de um elemento de transposição, o qual poderia estar envolvido com os mecanismos que geraram a alta frequência de mutações nesse somaclone.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

As sementes da linhagem de milho Cat-100-6, bem como as sementes da geração R2 do Variante Somaclonal S1587 foram obtidas do Banco de Germoplasma do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Seleção de Plantas *Adh-0*

Plantas deficientes na atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH) foram selecionadas através da polinização de progênes R2 do variante somaclonal S1587, com pólen da mesma progênie tratado com vapores de álcool alílico (Schwartz & Osterman, 1976).

O álcool alílico quando adicionado ao meio de cultura, atinge o citoplasma das células, onde pela atividade de ADH é oxidado transformando-se em acroleína (Fig. 3). Este aldeído é extremamente tó-

xico e ocasiona a morte de células que apresentam atividade de ADH. Desta forma as células que não possuem atividade ADH não fazem a conversão do álcool alílico em acroleína, não sendo portanto afetadas.

O pólen foi coletado entre 8 e 10 horas da manhã, separado das anteras com ajuda de uma peneira e tratado com álcool alílico.

Amostras de aproximadamente 100 mg de grãos de pólen foram depositadas no fundo de erlenmeyers de 250 ml. Foram adicionados 10 µl de álcool alílico na parede dos frascos e estes foram então hermeticamente fechados, constituindo-se em câmaras de vapor. Os tratamentos tiveram a duração de 15 a 30 minutos.

Após o tratamento, o pólen foi utilizado para polinizar plantas da geração R2 do somaclone S1587.

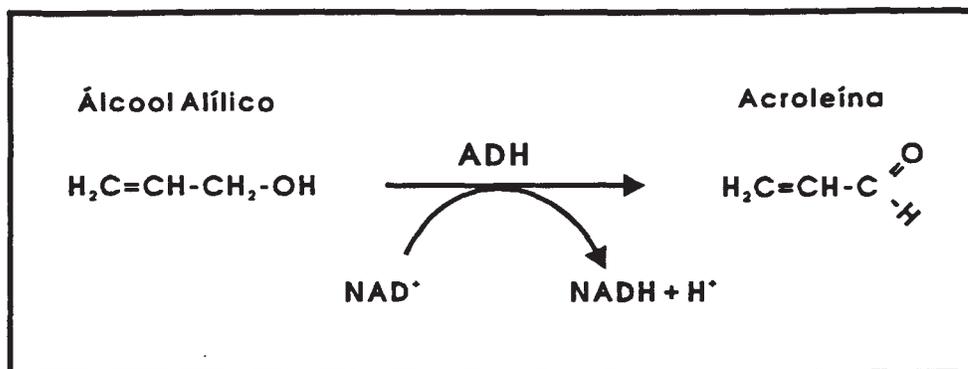


Figura 3: Reação de oxidação do Álcool Alílico catalisada pela ADH.

As sementes da geração R3 foram plantadas e as plantas foram autofecundadas, obtendo-se sementes da geração R4, que foram monitoradas para a atividade de ADH.

Sementes com atividade nula para a ADH foram plantadas e autofecundadas. As sementes obtidas (geração R5) foram plantadas e as plantas foram caracterizadas, genotipicamente, através do teste de atividade de ADH em grãos de pólen. Com o auxílio de uma lupa foram examinados aproximadamente 300 grãos de pólen de cada planta.

Foram consideradas plantas homozigotas *Adh/Adh* aquelas que apresentaram atividade de ADH em 100% dos grãos de pólen, plantas homozigotas *adh-0/adh-0* aquelas que apresentaram ausência de ati-

vidade de ADH em 100% dos grãos de pólen. As plantas que apresentaram atividade de ADH em aproximadamente 50% dos grãos de pólen foram consideradas heterozigotas *Adh/adh-0*.

Determinação Qualitativa da Atividade de ADH

A capacidade da ADH em reduzir o cloreto de p-nitro-blue-tetrazolium foi utilizada como indicador da atividade enzimática em extratos de escutelos obtidos a partir de sementes.

Procedimento:

- Colocar as sementes para germinar em papel de germinação embebido em água durante a noite.
- Transferir aproximadamente 10 mg do escutelo para um tubo Eppendorf.

- Adicionar 100 µl de tampão de homogeneização (Tris-HCl 62 mM pH 6,8; DTT 1 mM; Glicerol 20%).
- Macerar com bastão de vidro.
- Centrifugar por 15 minutos.
- Aplicar alíquotas de 1 µl do sobrenadante em papel Whatman 3 MM.
- Incubar no escuro o papel com 50 ml de tampão de revelação, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.
- Interromper a revelação adicionando 25 ml do fixador e incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente.
- Lavar com água destilada durante 20 minutos.

Teste de Atividade de ADH em Grãos de Pólen

O cloreto de p-nitro-blue-tetrazolium foi utilizado como o indicador da atividade enzimática em grãos de pólen submetidos à germinação.

As panículas das plantas foram cobertas logo pela manhã permanecendo assim por uma hora. Logo após este período, os grãos de pólen foram recolhidos e trazidos imediatamente para o laboratório, evitando-se assim possíveis contaminações.

Os grãos de pólen foram distribuídos em placas de Petri contendo 5 ml de meio de germinação. Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foram adicionados 2 ml de tampão de coloração. As placas foram mantidas no escuro durante 20 a 30 minutos, à temperatura ambiente, e acrescentou-se 1 ml de fixador.

Soluções:

Tampão de Revelação

Tris-HCl 100 mM pH 8,5	96 ml
Etanol	1 ml
Solução Estoque NAD 100x	1 ml
Solução Estoque NBT 100x	1 ml
Solução Estoque PMS 100x	1 ml

NAD 100X

Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo	50 mg
Tris-HCl 100 mM pH 8,5	5 ml

NBT 100X

p-Nitro-Blue-Tetrazolium	40 mg
Tris-HCl 100 mM pH 8,5	5 ml

PMS 100X

Phenazine-Methosulfate	15 mg
H ₂ O	5 ml

Fixador

Metanol	300 ml
Ácido Acético	70 ml
H ₂ O	630 ml

Meio de Germinação

Sacarose	15%
Ca(NO ₃) ₂	0,03%
H ₃ BO ₃	0,01%
MgSO ₄	0,02%
KNO ₃	0,01%
Trizma-Base	0,01%
Titular para pH 6,5 com NaOH 2M	
Autoclavar	

Após a confirmação de plantas homozigotas e heterozigotas, positivas e negativas quanto a atividade da enzima álcool desidrogenase, o mutante então identificado em nosso laboratório foi autofecundado durante 5 gerações e posteriormente analisado a nível molecular.

DNA genômico foi extraído, a partir de espiguetas e plântulas para posteriores experimentos de Southern comparativos, para uma confirmação definitiva do genótipo das plantas utilizadas.

O DNA genômico de plantas homozigotas *adh-0/adh-0* foi utilizado para a construção de uma biblioteca genômica. Como sonda para esta biblioteca genômica foi utilizado um clone de cDNA do gene *Adh-1F* de milho (pZML 793) onde foram isolados dois clones denominados Adh1-5.1 e Adh1-7.2.

A seguir os clones isolados foram parcialmente sequenciados para que fosse possível identificar a causa da mutação.

Linhagens de Bactérias

Em seguida são descritas as linhagens de bactérias (*Escherichia coli*) utilizadas durante a realização deste trabalho. A descrição detalhada de cada linhagem encontra-se no Apêndice I.

DH5α

Genótipo relevante: *F supE44 Δ(lacZYA -argF)U169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan, 1983).

Uso: preparação de células competentes para as transformações realizadas durante as subclonagens em pBluescript KS+.

SRB

Genótipo relevante: *sbcC recJ, uvrC umuC::Tn5(Kan^r supE44 lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 mcrA Δ(mcrBC hsdRMS mrr)171 [F' proAB lacI^a lacZΔM15]*

Uso: hospedeira utilizada na análise da biblioteca genômica de milho preparada no bacteriófago λDASH (Stratagene).

SRB(P2)

Genótipo relevante: hospedeira SRB lisogênica para o bacteriófago P2.

Uso: o mesmo da hospedeira SRB.

DL538

Genótipo relevante: *hsdR mcrA mcrB recD sbcC* (Whittaker *et al.*, 1988).

Uso: hospedeira do bacteriófago λ DASH durante a seleção de clones recombinantes da biblioteca genômica de milho.

Plasmídeos**pBluescript KS⁺**

O plasmídeo pBluescript KS⁺ (Stratagene) foi utilizado como vetor nas reações de subclonagem. Maiores detalhes deste plasmídeo encontram-se descritos no Apêndice II.

pZML793

Clone de cDNA contendo 1592 pb do gene *Adh-1F* isolado de uma linhagem comercial de milho (Cromac), homocigota para o alelo *Adh1-CroF* (Dennis *et al.*, 1984).

pH 2.3

O plasmídeo pH2.3 (Fig. 4) contém o fragmento Hind III de 2,3 Kb, do gene *Adh-1F* inserido no plasmídeo pBR322 (Bennetzen *et al.*, 1984). Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Peter Starlinger da Universidade de Cologne, Alemanha.

pZ22.3

O clone de cDNA de α -zeína de 22 KDa (Marks *et al.*), contendo um inserto de aproximadamente 1 Kb clonado no sítio Pst I de pBR322. Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Dr. Brian Larkins da Universidade do Arizona, Tucson, USA.

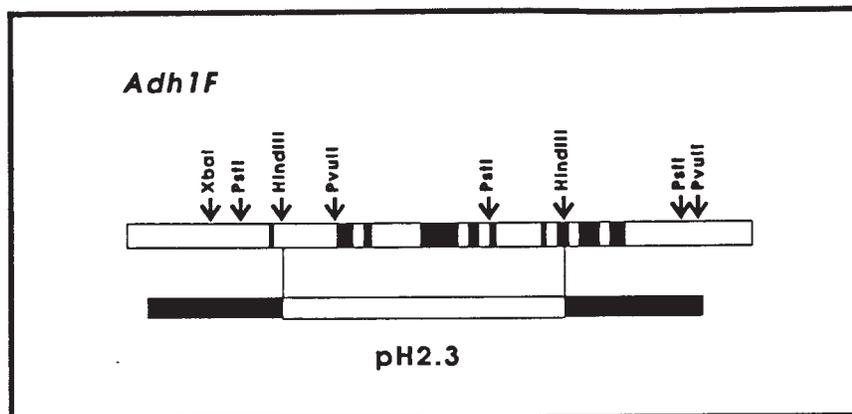


Figura 4: Diagrama esquemático mostrando a posição do inserto de 2,3 Kb do plasmídeo pH2.3 no gene *Adh-1F*. As áreas hachuradas representam os “exons” presentes no gene.

As técnicas de biologia molecular utilizadas neste trabalho encontram-se descritas a seguir:

Isolamento de DNA de Plantas

O DNA utilizado nos experimentos de “Southern blot”, bem como para a construção da biblioteca genômica foi preparado conforme descrito em Rivin *et al.*, (1982).

Procedimento:

- Lavar as folhas com água destilada e incubar durante 15 minutos em hipoclorito de sódio 5%. Lavar com água estéril e secar ao ar. Em caso de plantas obtidas em condições estéreis, não há

necessidade de esterilização em hipoclorito.

- Congelar o material em nitrogênio líquido. O material pode ser estocado em nitrogênio líquido.
- Pulverizar o material em graal pré-resfriado em nitrogênio líquido. Manter o material congelado por adição de nitrogênio líquido.
- Adicionar 8 a 20 volumes de tampão de homogeneização. Manter em gelo por 5 minutos.
- Homogeneizar em “polytron” durante 30 segundos, na maior velocidade. Repetir a homogeneização. Manter a solução em banho de gelo.

- Filtrar o homogeneizado em três camadas de gaze estéril em funil de Buchner com auxílio de uma bomba de vácuo.
- Sedimentar os núcleos centrifugando o filtrado a 350 g durante 10 minutos, a 4°C (2.000 rpm, rotor JA-20, centrífuga Beckman). Desprezar o sobrenadante. Manter em gelo.
- Mantendo a amostra em gelo, gentilmente porém, rapidamente, suspender o sedimento em tampão de lise gelado.
- Depois de suspenso, adicionar N-laurilsarcosinato de sódio 20% na proporção de 1:10 em tampão de lise. Incubar durante uma hora a 50°C.
- Adicionar 0,5 g de cloreto de céσιο (CsCl) por ml de lisado.
- Remover proteínas insolúveis e plasmídeos por centrifugação a 17.000 g (12.000 rpm, rotor JA-20, centrífuga Beckman), durante 15 minutos, a 4°C. Se necessário filtrar o sobrenadante em gaze estéril.
- Adicionar brometo de etídio até atingir a concentração de 300 µg/ml. Ajustar a concentração de CsCl, o índice de refração deve ser de 1.3895. Centrifugar durante 20 horas a 50.000 rpm em rotor Vti-80, em ultracentrífuga Beckman.
- Remover a banda fluorescente, cuidadosamente, com uma seringa munida de agulha 30 x 12 mm.
- Remover o brometo de etídio por sucessivas extrações com butanol equilibrado com água na proporção de 1:1, até que não haja mais vestígios de coloração na fase do butanol.
- Dialisar com TE, ou adicionar dois volumes de água e precipitar o DNA com adição de 2 volumes de etanol gelado, incubar durante duas horas a -20°C.
- Após a diálise, adicionar 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol gelado, incubar durante duas horas, à temperatura ambiente.
- Coletar o DNA em bastão de vidro ou por centrifugação. Lavar o DNA com etanol 70%.

Soluções:

Tampão de Homogeneização

Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; Sacarose 0,3 M; MgCl₂ 5 mM

Tris/HCl pH 8.0 1 M	5,0 ml
MgCl ₂ 0.2 M	2,5 ml
Sacarose	10,27 g
H ₂ O	(qsp) 100 ml

Tampão de Lise

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA
20 mM

Tris/HCl pH 8.0 1 M	0,5 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,4 ml
H ₂ O	(qsp) 10 ml

Tampão de Diálise (TE)

Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA
1 mM

Isolamento de DNA de plasmídeos em larga escala

Foi utilizada a técnica de lise alcalina descrita em Sambrook et al. (1989), com algumas modificações.

Procedimento:

- Inocular 10 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado a partir de uma única colônia, e incubar a 37°C durante a noite em shaker a 250 rpm.
- Na manhã seguinte inocular 30 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado com 0,1 ml da cultura obtida durante a noite, e incubar a 37°C com agitação vigorosa (300 rpm) até a cultura atingir $DO_{600} = 0,6$ (final da fase de crescimento exponencial).
- Inocular 25 ml da cultura obtida na etapa anterior em 500 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado e pré-aquecido a 37°C, em erlenmeyer de 2 litros. Incubar a 37°C com agitação vigorosa até $DO_{600} = 0,6$ a 0,8 (~ 2,5 horas).
- Adicionar 2,5 ml de solução de cloranfenicol 34 mg/ml em etanol. A concentração de cloranfenicol no meio deve ser de 170 µg/ml. A etapa de amplificação é desnecessária para plasmídeos que apresentam replicon derivado dos plasmídeos pMB1 e ColE1, entre os quais estão incluídos os plasmídeos derivados de pBR322 e pUC. Incubar a 37°C sob vigorosa agitação (300 rpm) durante 12 a 16 horas.
- Centrifugar o cultivo a 7.000 rpm em rotor Beckman JA-14 durante 10 minutos a 4°C.
- Suspender o sedimento, obtido a partir de 500 ml de cultivo, em 4 ml de solução I. Distribuir a suspensão em um tubo de centrifuga de 30 ml (polipropileno).
- Adicionar 1 ml de solução de lisozima (25 mg/ml em solução I). Misturar bem e manter a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Adicionar 10 ml de solução II, recentemente preparada. Misturar o conteúdo lentamente, por repetidas inversões. Manter em gelo durante 10 minutos.
- Adicionar a cada tubo 7,5 ml de solução de acetato de potássio 3 M, gelada. Misturar bem por inversão, até o desaparecimento das diferentes fases líquidas. Manter em gelo durante 10 minutos. Um precipitado floculoso será formado. O precipitado é constituído de DNA cromossômico, RNA de alto peso molecular e complexos de Potássio/SDS/Proteína/Complexos de Membrana.
- Centrifugar o lisado a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C em rotor Beckman JA-20. Se não ocorrer formação de sedimento, centrifugar novamente. Falha na sedimentação, geralmente ocorre devido a uma inadequada mistura do lisado com a solução de acetato de potássio.
- Filtrar o sobrenadante em 4 camadas de gaze estéril. Distribuir o filtrado em dois tubos novos de centrífuga (polipropileno).
- Adicionar 0,6 volumes de isopropanol. Misturar bem e manter à temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Centrifugar a 11.000 rpm em rotor Beckman JA-20 durante 10 minutos à temperatura ambiente.
- Lavar o sedimento com etanol 70% à temperatura ambiente. Secar o sedimento.
- Dissolver o sedimento em 4 ml de TE.
- Adicionar 4,4 g de cloreto de céσιο. Misturar até a completa dissolução. Adicionar 0,4 ml de solução de brometo de etídio (10 mg/ml). A densidade final da solução deve ser de 1,55 g/ml, correspondente a um índice de refração de ~ 1,3860.
- Centrifugar a solução a 8.000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente em rotor Beckman JA-20. Complexos formados entre o brometo de etídio e proteínas bacterianas deverão flutuar na solução. Remover a solução clara e avermelhada abaixo dos resíduos e transferir para tubos de ultracentrífuga.
- Centrifugar os gradientes a 60.000 rpm durante 16 a 20 horas (Rotores Vti65 ou Vti80), ou 45.000 rpm durante 48 horas (Rotor Ti 50), ou 60.000 rpm du-

- rante 24 horas (Rotores Ti 65 ou Ti 70.1), a 20°C.
- Com o auxílio de uma seringa munida de agulha 30 x 12, coletar a banda de DNA. Duas bandas de DNA, localizadas no centro do tubo, devem ser visíveis sob luz ordinária. As bandas podem ser melhor visualizadas com iluminação UV, com a desvantagem de que este comprimento de onda promove quebras no DNA, portanto deve-se iluminar com luz UV o mais afastado e breve possível. A banda superior consiste de DNA linear cromossômico e DNA plasmidial relaxado com o corte de uma das cadeias de DNA. A banda inferior consiste de DNA plasmidial superespiralado. O sedimento no fundo do tubo, ou na lateral do tubo, no caso de rotores verticais, consiste de complexos de RNA/brometo de etídio.
 - Distribuir a amostra contendo DNA em tubos eppendorf e adicionar igual volume de n-butanol saturado em água.
 - Misturar as fases com vortex.
 - Centrifugar durante 30 segundos à temperatura ambiente.
 - Remover a fase alcoólica (superior).
 - Repetir as etapas anteriores até que toda a cor vermelha desapareça em ambas as fases.
 - Remover o cloreto de céσιο através de Diálise contra 1.000 volumes de TE durante 24 a 48 horas com 3 a 4 trocas de TE. Um método alternativo para a remoção do cloreto de céσιο consiste em diluir a amostra com 3 volumes de água e em seguida precipitar o DNA com dois volumes de etanol durante 15 minutos a 4°C seguido de centrifugação a 10.000 rpm (Rotor Beckman JA-20), durante 15 minutos a 4°C. Dissolver o DNA precipitado em aproximadamente 1ml de TE.
 - Determinar a concentração e analisar a qualidade de DNA, através de eletroforese em gel de agarose.

Soluções:

Solução I

Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; glicose 50 mM; EDTA 10 mM

Tris/HCl pH 8.0 1 M	2,5 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	2,0 ml
Glicose 2 M	2,5 ml
H ₂ O	(qsp) 100 ml

Autoclavar durante 15 minutos e armazenar a 4°C.

Solução II

NaOH 0,2 N; SDS 1%

NaOH 2 N	1ml
SDS 10%	1 ml
H ₂ O	(qsp) 10 ml

Solução de Acetato de Potássio

Acetato de potássio 5M	60,0 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
H ₂ O	28,5 ml

TE

Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM

Minipreparação de DNA de plasmídeos

- Inocular 5 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado, com uma única colônia de bactéria. Incubar sob vigorosa agitação durante a noite.
- Transferir 1,5 ml da cultura para um tubo Eppendorf, centrifugar durante 10 segundos em velocidade máxima. Descartar o sobrenadante, manter cerca de 50 a 100 µl. Se preferir, repetir a operação com mais 1,5 ml de cultura.
- Misturar bem com o auxílio de um vortex.

- Adicionar 300 µl de TENS.
- Misturar bem novamente com vortex.
- Adicionar 150 µl de acetato de sódio 3M, pH 5,2.
- Misturar bem novamente com vortex.
- Centrifugar durante 2 a 5 minutos à temperatura ambiente.
- Transferir o sobrenadante para um tubo Eppendorf.
- Adicionar 0,9 ml de etanol gelado, misturar bem por inversão.
- Centrifugar durante 10 minutos à temperatura ambiente.
- Descartar o sobrenadante e adicionar etanol 70%. Centrifugar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Repetir a lavagem com etanol.
- Secar o sedimento e ressuspender em 50 µl de TE contendo 20 µg/µl de RNase

Soluções:

TENS

Tris-HCl 10mM, pH 8,0; NaOH 0,1 N; SDS 0,5%

Tris-HCl 1 M pH 8,0	0,1 ml
NaOH 2 N	0,5 ml
SDS 10%	0,5 ml
H ₂ O	8,9 ml

Acetato de Sódio 3 M

Acetato de sódio (anidro) 49,2 g

H₂O qsp 200 ml

Ajustar para pH 5,2 com ácido acético.

Preparação de Bacteriófago

Lambda em grande escala.

- Inocular 100 ml de meio LBM em um erlenmeyer de 500 ml com uma colônia de bactéria hospedeira apropriada. Incubar durante a noite a 37°C com agitação vigorosa (300 rpm).
- Ler a DO₆₀₀ da cultura. Calcular a concentração de células assumindo que 1U de DO corresponde a 8×10^8 células/ml.
- Transferir uma alíquota da cultura contendo 10^{10} células para um tubo de centrifuga estéril e centrifugar a 4.000 g durante 10 minutos. Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 3 ml de solução SM.
- Adicionar o fago e misturar rapidamente. O número de partículas de fago a ser utilizado é crítico. Para fagos que apresentam um bom rendimento no crescimento (EMBL 3 ou EMBL4 e λ_{gt10}), 5×10^7 pfu (“*plaque forming unit*”) devem ser adicionados à suspensão de células. Para fagos da série Charon, devem ser utilizados 5×10^8 pfu.
- Incubar durante 20 minutos a 37°C com suave agitação.
- Transferir as células infectadas para 500 ml de meio LBM em um Erlenmeyer de 2.000 ml. Incubar a 37°C com vigorosa agitação (300 rpm). Ocorrerá crescimento simultâneo da bactéria e fagos, resultando em uma lise da cultura após, aproximadamente, 6 horas. A lise poderá ser monitorada a partir de 4 horas de cultivo, efetuando-se sucessivas leituras de DO₆₀₀. A queda da DO₆₀₀ indicará o momento da lise.
- Após a cultura ter atingido a lise desejada, adicionar 10 ml de clorofórmio e incubar a 37°C durante 10 minutos com vigorosa agitação.
- Manter o cultivo imóvel durante 10 minutos em gelo e transferir a cultura para tubos de centrifuga (Beckman JA-10) com muito cuidado para não verter também o clorofórmio. Centrifugar durante 10 minutos a 7.000 rpm a 4°C.
- Decantar cuidadosamente o sobrenadante e adicionar 50 µl de RNase e 500 µl de DNase. (Soluções Estoques em

- água: DNase = 1 mg/ml, RNase = 10 mg/ml). Incubar durante 30 a 60 minutos, a 37°C, sob suave agitação, em shaker.
- Adicionar 29,2 g de NaCl, dissolver por agitação e manter em gelo durante uma hora.
 - Transferir o cultivo para tubos de centrifuga (polipropileno) e centrifugar a 10.000 rpm em rotor Beckman JA-10, durante 10 minutos a 4°C.
 - Transferir o sobrenadante para um erlenmeyer de 1.000 ml e adicionar 50 g de polietileno glicol (PEG 8.000). Dissolver à temperatura ambiente, com o auxílio de um agitador magnético, porém lentamente. Manter em gelo durante, no mínimo, uma hora ou ainda, durante a noite, em gelo, mantido em geladeira.
 - Centrifugar a 10.000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C.
 - Decantar o sobrenadante, com cuidado e retirar o máximo de líquido dos frascos, mantendo-os invertidos, por alguns minutos, sobre papel absorvente.
 - Ressuspender o sedimento em 8 ml de solução SM, lavando bem as paredes dos frascos.
 - Transferir esta suspensão para tubos Falcon (ou polipropileno) estéreis, e adicionar igual volume de clorofórmio, misturar em vortex durante 30 segundos. Centrifugar durante 10 minutos a 3.000 rpm à temperatura ambiente. Recolher a fase aquosa.
 - Adicionar 0,5 g de cloreto de céσιο por ml da suspensão de bacteriófago. Agitar até a completa dissolução do cloreto de céσιο.
 - Transferir cuidadosamente a suspensão ao topo de um gradiente descontínuo de cloreto de céσιο, previamente preparado, em tubos (Ultraclear) para Rotor SW41 de ultracentrifuga Beckman.
 - O gradiente descontínuo é preparado adicionando-se 1,0 ml de solução I de cloreto de céσιο no fundo de um tubo para rotor SW41. Em seguida adiciona-se 1,5 ml de solução II de cloreto de céσιο sobre a primeira solução adicionada (solução I). Marcar com uma caneta a posição do término da solução I e início da solução II. Finalmente, adicionar 1,5 ml de solução III.
 - Importante: Adicionar lentamente as soluções para que não ocorra uma mistura das mesmas.

- Ultracentrifugar a 22.000 rpm durante 4 horas a 4°C.
- Coletar as partículas de bacteriófago com o auxílio de uma seringa, perfurando o tubo, logo abaixo da banda contendo o fago. Uma banda muito tênue é formada entre as duas primeiras camadas do gradiente. A banda poderá ser melhor visualizada, colocando-se um fundo escuro para os tubos. As partículas podem ser também recolhidas com o auxílio de uma micropipeta de 1 ml, retirando-se, cuidadosamente, parte da solução que recobre a banda e posteriormente, ainda com o auxílio de uma micropipeta, retirar diretamente a banda contendo as partículas de fago.
- Transferir a amostra para membrana de diálise. Dialisar durante uma hora, contra 1.000 volumes de Tris-HCl 50 mM contendo MgCl₂ 10 mM.
- Transferir a amostra dialisada para um tubo falcon estéril de 15ml e adicionar EDTA 0,5 M pH 8,0 para uma concentração final de 20 mM.
- Adicionar Pronase para uma concentração final de 0,5 mg/ml, ou adicionar Proteinase K, para uma concentração final de 50 µg/ml.
- Adicionar SDS 10% para uma concentração final de 0,5%. Misturar por repetidas inversões.
- Incubar durante uma hora, a 37°C.
- Resfriar a amostra à temperatura ambiente e adicionar igual volume de fenol. Misturar gentilmente por repetidas inversões.
- Separar as fases por centrifugação a 3.000 rpm em uma centrífuga de mesa à temperatura ambiente.
- Transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo e extrair com igual volume de fenol-clorofórmio.
- Recuperar a fase aquosa por centrifugação e extrair com clorofórmio.
- Transferir a amostra para tubos Eppendorf e adicionar 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M pH 7,0. Misturar e adicionar dois volumes de etanol. Misturar bem.
- Manter durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 15 minutos à temperatura ambiente. Lavar o sedimento com etanol 70%. Centrifugar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar o sobrenadante e ressuspender os sedimentos em TE, contendo

RNAse (40 µg/ml). O volume total não deverá ultrapassar 0,5 ml. Dissolver o DNA e armazená-lo em geladeira.

Soluções:

Solução de SM

Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 100 mM, MgSO ₄ 10 mM	
Tris-HCl 1 M pH 7,5	10,0 ml
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,44 g
ou.6H ₂ O	0,46 g
H ₂ O	qsp 200 ml

Esterelizar por autoclavagem.

Top Agarose.

Agarose 0,7% em 10 mM de sulfato de magnésio. Esterelizar por autoclavagem.

Soluções de Cloreto de Césio (Gradiente descontinuo).

Solução	Densidade (g/ml)	CsCl (g)	SM (ml)	Índice de Refração.
I	1,70	95	75	1,3990
II	1,50	67	82	1,3815
III	1,45	60	85	1,3768

Armazenar em geladeira.

Minipreparação de DNA de Bacteriófago Lambda.

- Inocular 50 ml de meio LBM em um erlenmeyer de 250 ml com uma colônia de bactéria hospedeira apropriada. Incubar durante a noite a 37°C, com vigorosa agitação (300 rpm).
- Ler a DO₆₀₀ da cultura. Calcular a concentração de células assumindo que 1U de DO equivale a 8×10^8 células/ml.
- Transferir uma alíquota da cultura contendo 6×10^8 células para um tubo de cultura e adicionar $1,125 \times 10^8$ pfu de lambda Charon, ou ainda, $1,125 \times 10^6$ pfu de lambda cI^{ts857}, EMBL, λgt10 ou λgt11.
- Incubar a 37°C durante 25 minutos.
- Incubar em um erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio LBM.
- Incubar a 37°C durante 5 a 9 horas com vigorosa agitação (300 rpm). Algumas culturas lisam a partir de 5 horas de incubação, apresentando um aspecto turbido e com abundantes restos bacterianos.
- Após a lise do cultivo, adicionar 300 µl de clorofórmio. Agitar vigorosamente durante 10 minutos a 37°C.

- Resfriar os cultivos em gelo, e transferir o lisado para um tubo Corex estéril de 30 ml.
- Centrifugar a 8.000 rpm (Rotor JA-20 Beckman) durante 10 minutos a 4°C.
- Passar o sobrenadante para outro tubo Corex estéril de 30 ml, com o máximo cuidado para não arrastar também o clorofórmio.
- Adicionar 15 µl de RNase (10 mg/ml). Incubar durante 30 minutos a 37°C.
- Adicionar 15 ml de Solução PEG + NaCl a 4°C. Incubar no mínimo durante uma hora a 4°C.
- Centrifugar a 8.000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
- Eliminar o sobrenadante por aspiração, com o máximo cuidado, retirando todas as gotas das paredes do tubo. O PEG tem efeito inibidor sobre algumas endonucleases de restrição, e portanto é importante eliminar ao máximo os resíduos de Solução PEG + NaCl antes da suspensão do sedimento.
- Suspender o sedimento em 0,5 ml de tampão SM.
- Transferir para o tubo Eppendorf. Centrifugar durante 2 minutos à temperatura ambiente. Transferir o sobrenadante para um novo tubo Eppendorf.
- Adicionar 2,5 µl de SDS 10% e 5 µl de EDTA 0,5 M pH 8,5. Incubar durante 15 minutos a 68°C.
- Adicionar 0,5 ml de fenol saturado. Misturar com o auxílio de vortex. Centrifugar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Passar a fase superior para um novo tubo Eppendorf.
- Adicionar 0,5 ml de fenol- clorofórmio. Agitar com o auxílio de vortex. Centrifugar durante 2 minutos em microcentrífuga. Transferir a fase superior para um novo tubo Eppendorf.
- Adicionar 0,5 ml de clorofórmio. Agitar com o auxílio de vortex. Centrifugar durante 2 minutos. Transferir a fase superior para um novo tubo Eppendorf.
- Adicionar 12 µl de NaCl 5 M e 1 ml de etanol absoluto gelado (-20°C). Agitar lentamente por repetidas inversões. Deverá formar-se, imediatamente, um precipitado branco. Centrifugar durante 15 minutos a 4°C.
- Eliminar o sobrenadante. Lavar com 1 ml de etanol 70%. Centrifugar durante 15 minutos à temperatura ambiente.
- Eliminar o sobrenadante. Secar a vácuo.

- Suspender o sedimento em 50 μ l de TE.

Soluções:

PEG + NaCl.

Tris-HCl 1M pH 7,5	0,5 ml
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,11 g
PEG 6.000	7,3 g
H ₂ O	qsp 50 ml

Esterelizar por autoclavagem. Armazenar a 4°C.

Purificação de fragmentos de DNA a partir de gés de agarose utilizando-se papel DEAE

- Correr o gel na presença de 0,5 μ g/ml de brometo de etídio.
- Retirar o gel da cuba de eletroforese e localizar as bandas a serem eluídas com luz UV. Com o auxílio de um bisturi fazer uma incisão no gel, ao lado das bandas, e com o auxílio de pinças, inserir o papel de DEAE (DE 81 Whatman) de tamanho adequado até que o mesmo toque o fundo da placa.
- Recolocar o gel na cuba e continuar a eletroforese. Monitorar a migração do fragmento com lâmpada UV. Correr a eletroforese até que todo o DNA tenha migrado para o papel de DEAE.
- Cuidadosamente, remover o papel com o auxílio da pinça. Lavar o papel no tampão de corrida para retirar pedaços de agarose.
- A eluição dos fragmentos de DNA é realizada em uma ponteira de 1 ml previamente adaptada da seguinte forma: em uma ponteira de 1 ml colocar um pouco de lã de vidro siliconizada. Adaptar a ponteira em um tubo Eppendorf com tampa perfurada adequadamente. Colocar o papel contendo o DNA a ser eluído no interior da ponteira e adicionar 0,6 ml de tampão de eluição. Incubar a 37°C durante uma hora.
- Colocar a montagem do tubo Eppendorf e ponteira dentro de um tubo de centrifuga de mesa. Centrifugar a 2.000 rpm durante 5 minutos.
- Adicionar mais 200 μ l de tampão de eluição e centrifugar.
- Dividir o eluato (aproximadamente 0,8 ml) em dois tubos Eppendorfs e adicionar 0,5 ml de n-butanol, centrifugar durante 30 segundos. Remover a fase orgânica (superior).
- Extrair uma vez com n-butanol puro, e mais uma vez com n-butanol equilibrado em água.

- Adicionar 1 ml de etanol gelado e manter a -70°C durante uma hora ou -20°C durante a noite.
- Centrifugar durante 15 minutos. Lavar o sedimento em etanol 70%.
- Secar o sedimento e ressuspender em volume apropriado de TE.

Soluções:

Tampão de Eluição

Tris-HCl 20 mM pH 8,0; EDTA 2 mM; NaCl 150 mM

Tris/HCl 1M pH 8,0	200 μ l
EDTA 0,5M pH 8,0	40 μ l
NaCl 5M	3,0 ml
H ₂ O	6,76 ml

Construção da Biblioteca Genômica

A biblioteca genômica do Somaclone (S1587) de milho foi construída em bacteriófago λ DASH (Stratagene). Maiores detalhes do fago λ DASH são descritos no Apêndice II.

O DNA genômico de milho preparado conforme descrito anteriormente, foi parcialmente digerido com a enzima Mbo I. Fragmentos de tamanhos entre 9 e 23 Kb foram isolados, através de ultracen-

trifugação em gradiente de sacarose conforme descrito em Sambrook *et al.*, (1989).

Os fragmentos obtidos contendo extremidades Mbo I foram ligados aos braços do fago λ DASH, obtidos através de digestão com a enzima de restrição Bam HI. As enzimas Mbo I e Bam HI, produzem extremidades complementares.

Os fagos recombinantes foram empacotados *in vitro* utilizando-se o kit GigaPack II - Packaging Extract (Stratagene).

A seleção dos clones recombinantes de *adh-1* foi realizada em placas de 135 mm, contendo 30.000 fagos por placa.

As placas foram cobertas com membranas de nylon (Hybond N, Amersham), marcadas com uma agulha contendo tinta nankin em três posições assimétricas. As membranas foram mantidas em contato com o top ágar durante 1 minuto.

As membranas foram cuidadosamente retiradas e incubadas por 2 minutos em solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M). Em seguida as membranas foram incubadas em solução de neutralização (Tris-HCl 0,5M, pH 7,2; NaCl 1,5 M; EDTA 1mM) durante 5 minutos, e finalmente lavadas em 2X SSC (1X SSC con-

tém, citrato de sódio 0,15 M e NaCl 0,15 M) durante 5 minutos.

Depois de secas as membranas foram incubadas durante 2 horas em estufa a 80°C.

As membranas foram submetidas a hibridação conforme descrito no ítem Hibridações em Materiais e Métodos.

Transferência de fragmentos de restrição “Southern Blot”

Transferência segundo “Southern”

Esta técnica foi utilizada nos experimentos de transferência de fragmentos de restrição de DNA genômico.

- Separar o DNA por eletroforese em gel de agarose. Fotografar o gel colocando uma régua milimetrada com a finalidade de dispor-se de uma referência do tamanho real.
- Despurinação: incubar o gel à temperatura ambiente durante 10 minutos em uma solução de despurinação, com leve agitação.
- Lavar o gel com H₂O.
- Desnaturação: incubar o gel em solução de desnaturação durante 60 minutos com leve agitação.
- Lavar com H₂O.

- Neutralização: incubar o gel em solução de neutralização durante 30 minutos à temperatura ambiente com leve agitação.
- Lavar com H₂O.
- Incubar em solução de neutralização durante mais 30 minutos.
- Colocar o gel em solução SSC 10X.
- Montar o seguinte sistema de transferência:
 - Papel Whatman 3 MM da mesma largura que o gel para servir como “ponte”.
 - Gel, ladeado por parafilm ou fitas de filme para Raio X.
 - Filtro de Nitrocelulose cortado do mesmo tamanho que o gel e embebido em solução SSC 2X. Evitar bolhas.
 - 2 Folhas de papel Whatman 3 MM embebidas em Solução SSC 2X.
 - 2 Folhas de papel Whatman 3 MM secas.
 - 4 cm de papel absorvente, cortado no mesmo tamanho que o gel.
 - Placa de vidro.
 - Peso entre 0,5 e 1 kg.

- Adicionar tampão de transferência aos reservatórios. Utiliza-se solução SSC 10X como tampão de transferência.
- Deixar o sistema montado (transferindo) durante 8 a 12 horas.
- Desmontar o sistema, sem retirar a membrana. Com uma caneta esferográfica marcar a posição das canaletas do gel e fazer um corte no canto superior esquerdo para orientar o filtro.
- Separar o gel do filtro. O filtro pode ser corado durante 15 a 30 minutos em uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) em água para comprovar a eficiência da transferência.
- Lavar o filtro em SSC 2X durante 2 minutos. Colocar o filtro de nitrocelulose entre papéis de filtro até que esteja seco (10 a 20 minutos, à temperatura ambiente).
- Incubar o filtro de nitrocelulose (entre papéis de filtro) a 80°C durante 2 horas.

Transferência Alcalina

Devido a menor eficiência de transferência, esta técnica foi utilizada na transferência e hibridação de subclones.

Este tipo de transferência pode ser realizada somente quando são utilizados filtros de nylon. Os filtros de nylon, apesar

de serem mais caros, apresentam uma maior resistência mecânica, maior resolução, maior sensibilidade, maior capacidade e podem desidratar-se com facilidade.

Procedimento:

- Separar o DNA por eletroforese em gel de agarose.
- Despurinação: incubar o gel à temperatura ambiente durante 15 minutos em uma Solução de Despurinação, com leve agitação.
- Lavar o gel com H₂O.
- Desnaturação: incubar o gel em solução de desnaturação durante 30 minutos com leve agitação.
- Substituir o tampão de desnaturação por tampão de transferência alcalina.
- Adicionar tampão de transferência alcalina aos reservatórios.
- Deixar o sistema montado (transferindo) durante 8 a 12 horas. Desmontar o sistema sem retirar o filtro de nylon do gel. Com o auxílio de uma caneta esferográfica, marcar a posição das canaletas do gel e fazer um corte no canto superior esquerdo para orientar o filtro.
- Separar o gel do filtro de nylon. O filtro pode ser corado durante 15 a 30 minu-

tos em uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) em água para comprovar a eficiência da transferência.

- Lavar o filtro em uma solução SSC 2X durante 2 minutos. Colocar o filtro de nylon entre papéis de filtro até que esteja completamente seco (10 a 20 minutos à temperatura ambiente).
- Incubar o filtro de nylon (entre papéis de filtro) a 80°C, durante 10 minutos.

Soluções:

Solução de Despurinação

HCl 0,25 N

HCl concentrado	10,5 ml
H ₂ O	qsp 500 ml

Solução de Desnaturação

NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M

NaCl	43,9 g
NaOH	10,0 g
H ₂ O	qsp 500 ml

Solução de Neutralização

Tris-HCl 0,5 M pH 7,2; NaCl 1,5 M;

EDTA 1 mM

Trizma-Base	30,3 g
NaCl	43,9 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	1 ml
H ₂ O	qsp 300ml
HCl concentrado	18 ml
H ₂ O	qsp 500ml

Solução de Transferência Alcalina

NaOH 0,25 M; NaCl 1,5 M

NaCl	43,9 g
NaOH	5,0 g
H ₂ O	qsp 500 ml

SSC 20X

Citrato de sódio	88,2 g
NaCl	175,3 g
H ₂ O	qsp 1.000 ml

Marcação de sondas de DNA utilizando-se o Kit Mega-prime™ Labelling Systems (Amershan)

- Dissolver o DNA a ser marcado para uma concentração entre 2 a 25 µg/ml em H₂O ou Tris-HCl 10 mM pH 8,0, contendo 1 mM de EDTA.
- Adicionar 5 µl de Solução 1 (primer) a 1-30 µl da solução de DNA (25 a 50 ng de DNA).
- Desnaturar a amostra de DNA em banho-maria fervente durante 5 minutos. Transferir para o gelo imediatamente.

Reação:

DNA desnaturado	x μl
dNTPs frios omitindo o nucleotídeo marcado	4 μl
Tampão de Reação	5 μl
[$\alpha\text{-P}^{32}$] dNTP (Amershan)	5 μl
Klenow	2 μl
H ₂ O	qsp 50 μl

- Misturar gentilmente. Centrifugar momentaneamente. Incubar a 37°C durante 5 a 10 minutos ou ainda durante uma hora, à temperatura ambiente.
- Interromper a reação com a adição de 8 μl de EDTA 0,5 M pH 8,0 e 50 μl de STE.
- Isolar o DNA marcado através de filtração em gel em minicoluna .
 - Inserir no fundo de uma seringa descartável de 1 ml (seringa de insulina) uma pequena quantidade de lã de vidro siliconizada. Compactar a lã de vidro com o auxílio do êmbolo da seringa.
 - Preencher a seringa com Sephadex G-50 (Pharmacia) equilibrado com tampão STE.
 - Inserir a seringa em um tubo de centrífuga de 15 ml. Centrifugar a 1.600 g durante 4 minutos à temperatura ambiente em uma centrífuga de mesa. A resina deverá empacotar-se, tornando-se parcialmente desidratada. Continuar a adicionar a resina até que o volume empacotado seja aproximadamente 0,9 ml.
- Adicionar 0,1 ml de tampão STE e recentrifugar durante 4 minutos por mais duas vezes.
- Repetir a etapa anterior por mais duas vezes.
- Aplicar a amostra de DNA marcado no topo da coluna em um volume total de 0,1 ml. Caso seja necessário, usar tampão STE para completar o volume da amostra para 0,1 ml. Coloque a coluna em um tubo de centrífuga de 15 ml contendo no fundo um Eppendorf sem tampa.
- Recentrifugar nas mesmas condições descritas, coletando o DNA marcado no tubo Eppendorf.
- Remover a seringa contendo dNTPs radioativos não incorporados e outros componentes de baixo peso molecular. Com o auxílio de uma pinça, remover o tubo Eppendorf de dentro do tubo de centrífuga e

transferir a amostra para um novo tubo Eppendorf com tampa.

- Determinar a atividade específica da sonda determinando-se a atividade de uma alíquota (1-2 μ l) da amostra dissolvida em líquido de cintilação. Geralmente obtém-se a atividade específica entre 10^8 - 10^9 dpm/ μ g DNA.

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Sdpm} \times 1000}{\text{Va}(\mu\text{l}) \times \text{DNA}(\text{ng})}$$

Sdpm - Contagem da sonda.

Va - Volume da alíquota

DNA - ng da sonda

- A contagem poderá ser realizada também diretamente em uma alíquota (1-2 μ l) colocada em um tubo Eppendorf, que por sua vez será colocado no interior de uma frasco de cintilação. Neste caso o valor da contagem deverá ser multiplicado pelo fator 2, visto que a eficiência de contagem de radiação Cerenkov em H_2O é de aproximadamente 50%.

Monitoramento do progresso de reações de marcação através de absorção em filtro DE 81

- Transferir 1 μ l da reação para o centro de um filtro DE 81. Colocar o filtro em

um frasco de cintilação e determinar a contagem sem adição de líquido de cintilação com a janela de detecção de Trítio do contador de cintilações (Radiação Cerenkov).

- Lavar o filtro três vezes, por 5 minutos em solução 0,5 M Na_2HPO_4 .
- Lavar o filtro duas vezes, por 1 minuto em H_2O .
- Lavar o filtro duas vezes, rapidamente em etanol 95%.
- Secar o filtro e determinar a contagem, sem adição do líquido de cintilação. O filtro mede a contagem da radioatividade incorporada no DNA.

Calcular o Rendimento:

$$R(\%) = \frac{\text{dpm do filtro lavado} \times 100}{\text{dpm do filtro sem lavar}}$$

- A contagem do filtro, após a lavagem, poderá ser utilizada para se estabelecer uma estimativa específica da sonda preparada. Neste caso, a contagem obtida deverá ser multiplicada por fator 4, uma vez que, a contagem de radiação Cerenkov de filtros, na ausência de líquidos, apresenta uma eficiência de aproximadamente 25%.

Soluções:**STE**

Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA
1 mM, NaCl 0,1 M

Tris-HCl 1M pH 8,0	1,0 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	2,0 ml
NaCl 5 M	2,0 ml
H ₂ O	qsp 100ml

Sephadex G-50

Adicionar 5g de Sephadex G-50 DNA grade a 100 ml de STE estéril. Misturar gentilmente e deixar a resina hidratar por no mínimo 4 horas à temperatura ambiente. Deixar a resina decantar e trocar o Tampão STE. Armazenar em geladeira.

Hibridação de sondas radioativas com ácidos nucléicos imobilizados em membranas

Esta técnica foi utilizada para as hibridações das membranas obtidas da transferência de bacteriófagos, e também daquelas obtidas a partir de transferência de fragmentos de DNAs em géis de agarose.

- Preparar solução de pré-hibridação, aproximadamente 0,2 ml de solução de pré-hibridação para cada cm² de membrana.
- Transferir a membrana para um recipiente plástico (tipo Tupperware) e adicionar solução de pré-hibridação (0,2 ml/cm²).
- Incubar durante 2 a 4 horas sob leve agitação a 42°C.
- Desnaturar o DNA a ser utilizado como sonda, incubando-se em banho-maria fervente durante 5 minutos e transferir imediatamente para o gelo.
- Substituir no recipiente contendo as membranas a solução de pré-hibridação. Em seguida adicionar a sonda radioativa.
- Incubar à temperatura de 42°C durante a noite.
- Drenar o líquido de hibridação, este poderá ser recolhido para futura reutilização, e acondicionado em tubos Falcon de 50ml, o mesmo deverá ser armazenado a -20°C, entretanto os tubos Falcon deverão permanecer em frascos de vidro para a possível contenção das radiações. Caso contrário, esta solução de hibridação deverá ser tratada como resíduo radioativo.
- Remover a membrana e imediatamente submergi-la em solução SSC 2X contendo 0,5% de SDS à temperatura am-

biente. Agitar suavemente e substituir esta solução por nova solução SSC 2X, porém contendo 0,1% de SDS. Incubar durante 15 minutos, à temperatura ambiente sob leve agitação. Decantar a solução e repetir esta lavagem nas mesmas condições.

- Descartar a solução utilizada para as lavagens e adicionar solução SSC 0,1X contendo 0,1% de SDS. Incubar a 60°C durante 20 minutos sob leve agitação. Repetir esta etapa.
- Lavar brevemente a membrana com solução SSC 1X à temperatura ambiente. Secar o filtro mantendo o mesmo sobre papel de filtro. Fixar a membrana em um suporte (papel 3 MM ou papel cartão) e acondicioná-la em filme PVC. Membranas a serem reutilizadas não deverão ser secas e acondicionadas, úmidas, em filme PVC, fixadas em suporte e submetidas à exposição de filme Raio X.
- O tempo de exposição deverá ser determinado empiricamente. Genes de cópia simples geralmente podem ser detectados após 24 horas de exposição a -70°C, utilizando-se cassetes providos de intensificadores de fluorescência.

Soluções:

Soluções de Pré-hibridação

SSC 6X; N-laurilsarcosinato de sódio 0,1 %; SDS 0,2%; BLOTTO 0,05X; Formamida 50%

SSC 20X	30,0 ml
N-laurilsarcosinato de sódio 20%	0,5 ml
SDS 10%	0,2 ml
BLOTTO 1X	5,0 ml
Formamida deionizada	50,0 ml
H ₂ O	qsp 100,0 ml

BLOTTO 1X (Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer)

Leite em pó desnatado (Molico) 5% em água (Johnson et al. 1984)

Leite em pó desnatado	5,0 g
Azida sódica	20 mg
H ₂ O	qsp 100,0 ml

Armazenar a 4°C.

Formamida Desionizada

Adicionar a 200 ml de formamida, 5 g de Resina de troca iônica mixta, AG 501-X8 (Bio Rad), ou Dowex-XG8. Misturar lentamente com o auxílio de um agitador magnético, à temperatura ambiente durante 1 hora. Filtrar a formamida em papel Whatman 3 MM para remover

temperatura ambiente durante 1 hora. Filtrar a formamida em papel Whatman 3 MM para remover completamente a resina. Armazenar em frasco escuro a -20°C .

SSC 20X

Citrato de sódio	88,2 g
NaCl	175,3 g
H ₂ O	qsp 1.000 ml

Reutilização de membranas Hybond-N

Membranas que não ficaram secas durante todo o processo de hibridação podem ser reutilizadas para hibridação com novas sondas após a total remoção da primeira sonda radioativa.

- Incubar a membrana sob agitação a 45°C durante 30 minutos em NaOH 0,4 M.
- Transferir a membrana para uma solução Tris-HCl pH 7,5 0,2 M, SSC 0,1X, SDS 0,1%
- Incubar durante 30 minutos a 45°C .
- Lavar brevemente a membrana com uma solução SSC 0,1X.
- Verificar a completa remoção de sondas marcadas, expondo a membrana envolta

em filme de PVC ao filme de Raio X. Após a comprovação da remoção da sonda, a membrana poderá ser seca e então armazenada envolta em papel alumínio em dessecador à temperatura ambiente.

Reutilização de sondas

Normalmente somente uma pequena fração da sonda é utilizada durante o processo de hibridação, assim sendo, a mesma sonda poderá ser utilizada até sua deterioração ou o decaimento da atividade radioativa. Para que possam ser reutilizadas, as sondas de DNA devem ser redensaturadas. Para soluções aquosas, incubar a solução em banho maria fervente durante 10 minutos. Enquanto que as soluções contendo formamida desionizada devem ser incubadas em banho-maria a 70°C , durante 30 minutos.

As soluções assim tratadas podem então ser adicionadas às membranas pré-hibridadas conforme descrito anteriormente.

Marcação e Hibridação com Sondas Não Radioativas

Para a marcação de sondas não radioativa foi utilizado o Kit DIG da Boehringer Mannheim.

A sonda de DNA é obtida através da incorporação de dUTP marcado com digoxigenina, através de extensão com o fragmento Klenow da DNA Polimerase I, utilizando-se iniciadores (primers) randômicos. Após a hibridação, os híbridos são detectados através de imunoensaio enzimático, utilizando-se um conjugado de anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina ("DIG DNA labeling and detection Kit nonradioactive" - Cat. n. 1093 657 Boehringer). A revelação da hibridação é realizada com substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (X-Fosfato) e nitro-blue-tetrazolium (NBT). Os híbridos são detectados através da formação de precipitado azul. O fabricante descreve que o método é capaz de detectar 0,1 pg de DNA homólogo diluído em 50 ng de DNA heterólogo.

Alternativamente, a revelação pode ser realizada com o substrato da fosfatase AMPPD (Cat. n. 1357 328 - Boehringer), um dioxetano quando desfosforilado, tor-

na-se instável, determinando a emissão de luz, sendo que, neste caso os híbridos são detectados através da exposição a filmes radiográficos. Para revelação através de quimioluminescência o fabricante descreve uma sensibilidade cerca de 30 vezes maior que a descrita para a revelação com substrato colorido (detecção de 0,30 pg de DNA homólogo diluído em 50 ng de DNA heterólogo).

Reação de marcação

- Dissolver o DNA a ser marcado para uma concentração entre 2-25 µg/ml em H₂O ou Tris-HCl 10 mM pH 8,0, contendo 1 mM de EDTA.
- Desnaturar a amostra de DNA (25-50 ng de DNA em 20 µl) em banho-maria fervente durante 5 minutos. Transferir imediatamente para o gelo.

Reação:

DNA desnaturado	15 µl
Mistura de hexanucleotídeos	2 µl
Mistura de dNTPs	2 µl
Klenow	1 µl

- Centrifugar momentaneamente e incubar a reação durante, no mínimo, uma hora (até 20 horas) a 37°C.
- Adicionar:

ver durante 30 minutos a 37°C em 50 µl de TE.

Hibridação

A hibridação é realizada conforme descrito anteriormente para sondas radioativas, utilizando-se as soluções de pré e hibridação prescritas pelo distribuidor do Kit.

Deteção

Todas as incubações devem ser realizadas à temperatura ambiente, exceto as reações de coloração, e também devem ser realizadas sob leve agitação em "shaker".

- Lavar a membrana brevemente com tampão 1 (tampão malato).
- Incubar a membrana com 100 ml de tampão 2 (solução bloqueadora).
- Diluir o conjugado anti-digoxigenina-fosfatase alcalina 1:5.000 em tampão 2 (20 µl do conjugado em 100 ml de tampão 2).
- Incubar a membrana durante 30 minutos. O conjugado diluído pode ser recuperado e armazenado em geladeira, podendo ser reutilizado por várias vezes.
- Remover o excesso de conjugado através de duas lavagens de 15 minutos com 100 ml de tampão 1.
- Equilibrar a membrana com tampão 3.

Reação de revelação com X-Fosfato

- Incubar a membrana no escuro com 10 ml de solução de coloração recentemente preparada, em um invólucro plástico, à temperatura ambiente.

A precipitação deve iniciar-se em poucos minutos e usualmente completa-se após um dia. Não agitar durante o processo de revelação.

Reação de revelação por quimiluminescência

- Diluir a solução estoque de AMPPD (10 mg/ml) 1:100 em tampão 3 (200 µl de AMPPD em 20 ml de tampão 3).
- Incubar a membrana em invólucro plástico contendo 10ml de solução de AMPPD durante 5 minutos aproximadamente. O substrato diluído poderá ser reutilizado por várias vezes, quando armazenado a 4°C no escuro.
- Retirar o excesso de reagente e empacotar em filme PVC.

reutilizado por várias vezes, quando armazenado a 4°C no escuro.

- Retirar o excesso de reagente e empacotar em filme PVC.
- Incubar a membrana durante 5 a 15 minutos a 37°C.
- Expor a membrana ao filme Raio X durante 15 a 25 minutos, à temperatura ambiente.
- Membranas que não foram secas durante todo o processo poderão ser hibridadas novamente após serem lavadas com uma solução de NaOH 0,2 N contendo 0,1% de SDS, duas vezes durante 15 minutos, a 37°C, seguida por uma breve lavagem com uma solução SSC 2X.

Soluções:

Solução de Hibridação

SSC 6X; N-Laurilsarcosinato de Sódio 0,1 %; SDS 0,2%; Agente bloqueador 1%; Formamida 50%

SSC 20X	30,0 ml
N-laurilsarcosinato de sódio 20%	0,5 ml
SDS 10%	0,2 ml
Agente bloqueador 10%	20,0 ml
Formamida deionizada	50,0 ml
H ₂ O	qsp 100,0 ml

Tampão 1 (Malato)

Ácido Maléico 0,1 M, NaCl 0,15

Ácido Maléico	11,6 g
NaCl	8,76 g
NaOH	7,0 g

Titular para pH 7,5 com NaOH 2 N

H ₂ O	qsp 1.000 ml
------------------	--------------

Solução Estoque de Agente Bloqueador 10%.

Para preparar 200 ml de solução estoque, deve-se pesar 20 g de bloqueador em erlenmeyer de 500 ml, adicionar 150 ml de tampão 1 e finalmente pesar o erlenmeyer. Dissolver com o auxílio de um forno de microondas, agitando suavemente, até a completa dissolução. Reconstituir o peso total do erlenmeyer adicionando H₂O e completar o volume para 200 ml com tampão 1.

Tampão 2

Estoque de solução bloqueadora diluída 1:10 em tampão 1.

Tampão 3

Tris-HCl 10 mM pH 9,5; NaCl 0,1M; MgCl₂ 10 mM

Tris-HCl 1M pH 9,5	10 ml
NaCl	5,9 g
MgCl ₂ 2 M	5 ml

Reações de sequenciamento de plasmídeos dupla fita

Desnaturação do DNA

O DNA a ser utilizado no sequenciamento pode ser obtido através de mini-preparações de plasmídeos.

- Quantificar o DNA e diluir em H₂O para uma concentração de 250 µg/ml.
- Em uma alíquota de 40 µl da amostra de DNA adicionar 40 µl de tampão de desnaturação 2X. Incubar exatamente por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Interromper a desnaturação com adição simultânea de 8 µl de acetato de amônio 2 M pH 4,5 e 176 µl de etanol gelado. Misturar imediatamente.
- Manter a temperatura de -20°C durante 1 hora ou 15 minutos a -70°C.
- Centrifugar por 15 minutos.
- Lavar o sedimento com 0,5 ml de etanol gelado 70%. Centrifugar durante 15 minutos.
- Dissolver o sedimento em 20 µl de água. Manter a amostra em gelo até o momento do uso.

Reações de sequenciamento

- Para cada DNA a ser sequenciado, marcar tubos Eppendorf com A, C, T e G para as reações direta e reversa.

- Dispensar a mistura de sequenciamento nos tubos correspondentes.

Tubo A ⇒ A Mix- Short ou Long 2,5µl

Tubo C ⇒ C Mix- Short ou Long 2,5µl

Tubo T ⇒ T Mix- Short ou Long 2,5µl

Tubo G ⇒ G Mix- Short ou Long 2,5µl

- Manter os tubos em gelo.

Reação de Anelamento.

- Marcar dois tubos Eppendorf: um para a reação direta e um para a reação reversa.

DNA desnaturado	10 µl
Primer direto ou reverso	2 µl
Tampão de anelamento	2 µl

- Misturar e incubar durante 20 minutos a 37°C.
- Manter a temperatura ambiente durante, no mínimo, 10 minutos.

Preparação do Pré-Mix.

Número de Reações	1	2	8	n
H ₂ O	1 µl	2 µl	8 µl	n µl
Labelling Mix (1)	3 µl	6 µl	24 µl	n µl
T7 DNA Polimerase				
diluída (2)	2 µl	4 µl	16 µl	2n µl
dNTP radioativo (3)	1 µl	2 µl	8 µl	n µl
Volume total	7 µl	14 µl	56 µl	7n µl

(1) - Utilizar o Labelling mix A ou C conforme o dNTP Radioativo.

(2) - T7 DNA Polimerase diluída para 1,5 U/ μ l utilizando-se o Tampão de Diluição da enzima gelado. Geralmente a enzima é fornecida com concentração de 7,5 U/ μ l.

(3) - [35 S]dATP α S (Amersham - SJ 1304) ou [35 S]dCTP α S, 10 μ Ci/ μ l, >1.000 Ci/mmol.

- Misturar gentilmente e manter sempre em gelo.

As próximas etapas estão descritas para a realização de quatro reações simultâneas. Por exemplo, as reações diretas e reversas de dois plasmídeos.

- Colocar os tubos contendo as misturas de sequenciamento das quatro reações em banho maria a 37°C.
- Adicionar 6 μ l de pré-mix aos tubos contendo as reações de anelamento com intervalos de um minuto. Misturar gentilmente e centrifugar momentaneamente. Incubar a temperatura ambiente durante, exatamente, 5 minutos.
- Transferir 4,5 μ l da primeira reação para os respectivos tubos contendo as misturas de sequenciamento. Incubar a 37°C, durante, exatamente, 5 minutos.

- Repetir o mesmo procedimento para as outras reações com intervalos de um minuto.
- Após os 5 minutos de incubação, adicionar 5 μ l de stop solution para cada tubo da primeira reação. Transferir os tubos para o gelo. Repetir o procedimento para as outras reações com intervalos de um minuto.
- Centrifugar momentaneamente e armazenar a -20°C.
- Antes de “carregar” as amostras em gel de sequenciamento, incubá-las durante 2 minutos a uma temperatura entre 75°C e 80°C, transferi-las para o gelo e colocá-las, imediatamente no gel de sequenciamento.

Preparação do Gel de Sequenciamento

Tratamento das Placas de Vidro

- Lavagem das Placas. Manter a placa durante a noite submersa em solução NaOH 0,4 N.
- Retirar o gel com o auxílio de uma esponja.
- Lavar com água e detergente e finalmente com uma solução SDS 2%.
- Enxaguar muito bem com água.

Desengorduramento das Placas de Vidro

- Limpar as placas com papel absorvente embebido em álcool, seguido de papel absorvente embebido em acetona.

Tratamento das Placas de Vidro

- Os tratamentos devem ser realizados em capela.
- Placa Menor - Tratamento para reter o gel.
 - Em um tubo de polipropileno contendo 5 ml de etanol PA, adicionar 175 µl de ácido acético. Misturar bem e adicionar 17 µl de "Bind-Silane" (Pharmacia - Cod. n. 80 1129.41) Verter a solução sobre a superfície desengordurada da placa e, imediatamente, espalhar com papel absorvente, através de movimentos circulares. Esperar secar e verter sobre a placa 5 ml de etanol PA, espalhar novamente com movimentos circulares e deixar secar ainda no interior da capela.
- Placa Maior - Tratamento para repelir o gel.
 - Verter sobre a superfície desengordurada da placa 5 ml de "Repel-Silane" (Pharmacia Cod. n. 80 1129. 42), e imediatamente espalhar com papel absorvente, através de movimentos circu-

lares. Esperar secar e retirar o excesso do reagente espalhando alguns mililitros de água com papel em movimentos circulares (não esfregar).

Preparação do Gel

- Em duas provetas de 100 ml, adicionar:

Gel	5%	6%
Uréia	25,2 g	25.2 g
Acrilamida 40%	7,5 ml	9,0 ml
TBE 5X	12 ml	12 ml
H ₂ O	q s p 50 ml	

- Dissolver em banho maria a 60°C.
- Completar o volume para 60 ml.
- Filtrar em membrana de 0,45 µm.
- Adicionar 480 µl de persulfato de amônio 100 mg/ml em H₂O (recentemente preparado).
- Adicionar 30 µl de TEMED.
- Verter imediatamente nas respectivas placas.

Soluções

Tampão de Desnaturação

NaOH 2 N	2 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	8 µl
H ₂ O	8 ml

Acetato de Amônio 2 M pH 4,5

Acetato de amônio	15,4 g
H ₂ O	50 ml
Titular para pH 4,5 com Ácido Acético Glacial	
H ₂ O qsp 100 ml	

Solução de Acrilamida 40%

Em uma proveta de 100ml, colocar 38 g de acrilamida, 2 g de n-n-metileno-bisacrilamida em água (Milli-Q) para 80 ml. Misturar bem e dissolver em banho-maria a 40°C. Adicionar 1 g de Resina AG 501-X8. Manter sob agitação no mínimo durante uma hora. Conservar em frasco escuro na geladeira.

TBE 5X

Tris-Base	60,5 g
Ácido Bórico	25,7 g
H ₂ O	800 ml
Verificar o pH ~ 8,3	
H ₂ O qsp 1.000 ml	

Deleção Unidirecional com Exonuclease III

Este método foi descrito por Henikoff (1987). A técnica baseia-se em uma série de tratamentos enzimáticos em um fragmento de DNA clonado em um vetor apropriado. O segmento de interesse deve

estar clonado em sítio de policlonagem, de forma que permaneçam pelo menos dois sítios únicos entre o inserto e o sítio de ligação do primer de sequenciamento. A enzima de restrição que corta próximo (ou no interior) da região do inserto de interesse, a partir da qual deverão ser realizadas as deleções, deve deixar uma extremidade 5' protuberante ou abrupta, enquanto que, a digestão da outra extremidade, deve deixar uma extremidade contendo uma protuberância 3' de 4 bases.

A Exonuclease III não ataca uma extremidade 3' protuberante contendo 4 bases, assim sendo, a enzima digere uniformemente a fita de DNA a partir da outra extremidade 3'. A fita remanescente de DNA é então removida através de digestão com S1 Nuclease, na presença de cátions Zn em pH ácido. Após a inativação térmica, adiciona-se polimerase Klenow para reparar as extremidades. Finalmente os fragmentos são recircularizados através da ligação das extremidades abruptas.

Para obter-se 25 deleções sequenciais, inicia-se o experimento com 5-10 µg de DNA. Visto que, a Exonuclease III pode iniciar a digestão a partir de "nicks", determinando degradações indesejáveis, recomenda-se a utilização de DNAs pu-

rificados em cloreto de cézio, bem como a minimização dos tempos de tratamento com as duas enzimas de restrição.

- Digerir o DNA do plasmídeo completamente com duas enzimas de restrição. A extremidade a partir da qual devem ser realizadas as deleções deverá apresentar protuberância 5' ou ainda extremidade abrupta. Enquanto que a outra extremidade deve apresentar uma protuberância 3' de 4 pares de bases.
- Após as digestões, extrair a reação uma vez com fenol-clorofórmio e uma vez com clorofórmio. Após a centrifugação transferir a fase aquosa para um tubo Eppendorf e adicionar 0,1 volumes de NaCl 2 M e dois volumes de etanol gelado. Centrifugar e lavar o sedimento com etanol 70% gelado.
- Dissolver o sedimento em 60 µl de tampão de exonuclease.
- Em 25 Eppendorfs de 0,5 ml marcados sequencialmente, adicionar 7,5 µl da Mistura de S1 Nuclease. Manter em gelo.
- Aquecer o DNA em banho-maria a 37°C. Adicionar 500 U (até um 1/5 do volume) de Exonuclease III. Misturar o mais rapidamente possível. Continuar a

incubação a 37°C. Existe um lag de 20 a 30 segundos para o início da reação.

- Para deleções de 175-200 pb, remover alíquotas de 2,5 µl em intervalos de 30 segundos. Colocar as alíquotas nos Eppendorfs contendo a mistura de S1 Nuclease.
- Observação - A velocidade da digestão com a Exonuclease III pode ser controlada através da temperatura. Mantendo-se a concentração de enzima (250-500 U/µg de DNA) a velocidade da reação segue aproximadamente o padrão descrito na tabela abaixo.

22°C	75 bases/minuto
25°C	110 bases/minuto
30°C	200 bases/minuto
35°C	400 bases/minuto
37°C	500 bases/minuto
39°C	600 bases/minuto

- Após a retirada de todas as alíquotas, incubar as amostras a temperatura ambiente.
- Adicionar 1µl de tampão stop de S1 Nuclease e incubar a 70°C durante 10 minutos. Remover as alíquotas de 2 µl para análise em eletroforese em gel de agarose.

- Adicionar 1µl da Mistura de Klenow. Adicionar 1µl da mistura de nucleotídeos 0,4 mM. Incubar durante 10 minutos a 37°C.
- Remover as amostras para temperatura ambiente e adicionar 40µl da mistura de Ligase. Incubar durante 2 horas a 16°C.
- Utilizar alíquotas de 2-10 µl para transformação de células competentes.
- Isolar colônias individuais para análise de restrição.

Soluções:

Tampão da S1 Nuclease 10X

Acetato de Potássio 0,3 M;
NaCl 2,5 M; ZnSO₄ 100 mM; Glicerol 50 % (v/v)

Acetato de Potássio 3 M pH 4,6	1,1 ml
NaCl 5 M	5,0 ml
Glicerol	5,0 ml
ZnSO ₄	30 mg

Tampão da Ligase 5X

Tris-HCl 0,25 M pH 7,6; MgCl₂ 25 mM, DTT 5 mM; ATP 5 mM;
PEG-600 25 % (m/v)

Tris-HCl 1M pH 7,6	250 µl
MgCl ₂ 1M	25 µl
DTT 1 M	5 µl
ATP 100 mM	50 µl
PEG 600	250 mg
H ₂ O	qsp 1,0 ml

Tampão de Exonuclease

Tris-HCl 66 mM pH 8,0; MgCl₂ 0,66 mM

Tris-HCl 1M pH 8,0	66 µl
MgCl ₂ 0,1 M	66 µl
H ₂ O	qsp 1 ml

Mistura de S1 Nuclease suficiente para 25 reações.

Tampão S1 nuclease 10X	27 µl
S1 Nuclease	60 U
H ₂ O	172 µl

Tampão Stop da S1 Nuclease

Trizma-Base 0,3 M; EDTA 50 mM

Trizma-Base	363 mg
EDTA 0,5 M pH 8,0	1 ml
H ₂ O	qsp 10 ml

Mistura de Klenow

Tris-HCl 10 mM pH 8,0; MgCl₂ 20 mM; Klenow 3 U

Tris-HCl 0,1 M pH 8,0	3 µl
MgCl ₂ 1M	6 µl
H ₂ O	20 µl
Klenow	3 U

Mistura de Nucleotídeos

dCTP 100mM pH 7,5	4 µl
dATP 100mM pH 7,5	4 µl
dGTP 100mM pH 7,5	4 µl
dTTP 100mM pH 7,5	4 µl
H ₂ O	984 µl

Estável durante várias semanas se armazenado a -20°C .

Mistura de Ligase

Tampão de Ligase 5X	0,8 ml
H ₂ O	0,2 ml
T4 DNA ligase	5 U

Metodologia Básica

Metodologias básicas de rotina, tais como: 1) Clonagem em plasmídeos, 2) Transformação de *Escherichia coli*, 3) Plaqueamento de bacteriófago lambda, foram realizadas de acordo com o manual de Biologia Molecular “Molecular Cloning - A laboratory Manual” (Sambrook *et al.*, 1989).

Digestões com enzimas de restrição foram realizadas de acordo com as condições descritas pelos fornecedores.

Soluções Estoques

Acetato de Sódio 3M pH 5,2 ou pH 7,0

Dissolver 40,81 g de acetato de sódio. 3H₂O ou 24,6 g de acetato de Sódio Anidro em 80 ml de H₂O. Ajustar o pH para 5,2 ou para 7,0 com ácido acético glacial. Ajustar o volume final para 100 ml com H₂O. Esterilizar por autoclavagem.

Acetato de Amônio 10 M

Dissolver 77 g de acetato de amônio em 80 ml de H₂O. Ajustar o volume para 100 ml. Esterilizar por filtração.

ATP 0,1M (Trifosfato de Adenosina)

Dissolver 60 mg de ATP em 0,8 ml de H₂O. Com ajuda de fitas indicadoras de pH, ajustar o pH para 7,0 com NaOH 0,1 N. Completar o volume para 1 ml com H₂O. Distribuir em alíquotas de 200 μl e armazená-las a -70°C .

Brometo de Etídio 10 mg/ml

Adicionar 1 g de brometo de etídio a 100 ml de H₂O. Misturar com o auxílio de agitador magnético durante várias horas, até o corante dissolver-se completamente. Armazenar em frasco escuro ou envolto em papel alumínio e guardá-lo em geladeira.

Cloreto de Sódio 5 M

Dissolver 73 g de NaCl em H₂O para um volume final de 250 ml. Esterilizar por autoclavagem.

Cloreto de Magnésio 1 M

Dissolver 20,33 g de MgCl₂.6H₂O em H₂O para um volume final de 100 ml. Esterilizar por autoclavagem.

EDTA 0,5 M pH 8,0

Adicionar 46,5 g de etilenodiaminotetracetato dissódico.2H₂O em 150 ml de H₂O. Agitar vigorosamente com o auxílio de agitador magnético. Ajustar o pH para 8,0 com NaOH, adicionar 3 g de NaOH seguido de NaOH 0,2 N. Completar o volume para 250 ml de H₂O. Esterilizar por autoclavagem.

Pronase 20 mg/ml (Protease isolada de *Streptomyces griseus*)

Dissolver 200 mg de Pronase em 10ml de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 contendo 10 mM de NaCl e incubar a 37°C durante uma hora. Distribuir em alíquotas de 1 ml em tubos Eppendorf e armazená-los a -20°C.

Proteinase K (Protease isolada de *Tritirachium album*)

Dissolver 200 mg de Proteinase K em 10 ml de H₂O. Distribuir em alíquotas de 200 µl e armazená-las a -20°C.

RNAse A 10 mg/ml

Dissolver 200 mg de RNAse (Sigma R4875) em 20 ml de Tris-HCl pH 7,5 contendo 15 mM de NaCl. Incubar durante 15 minutos em banho-maria fervente e resfriar lentamente à temperatura ambien-

te. Distribuir em alíquotas de 1ml em tubos Eppendorf e armazená-los a -20°C.

N-Laurilsarcosinato de Sódio 20%

Dissolver 20 g de N-laurilsarcosinato de Sódio em 80 ml de H₂O estéril em banho-maria 68°C. Ajustar o volume para 100 ml com H₂O estéril.

SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio, Lauril Sulfato de Sódio).

Dissolver 20 g de SDS em 150 ml de H₂O estéril em banho-maria 68°C. Ajustar o pH para 7,2 com algumas gotas de HCl concentrado. Ajustar o volume para 200 ml com H₂O estéril.

TAE 50X

Dissolver 242 g de trizma-base e 18,6 g de EDTA dissódico em 600 ml de H₂O. Adicionar 57,1 ml de ácido acético glacial. Ajustar o pH para 7,4 com NaOH 2 N. Completar o volume para 1.000 ml.

Tampão de Amostra para Géis de Agarose

Em um tubo Eppendorf, preparar uma solução saturada de bromofenol blue, adicionando algumas miligramas do mesmo em 1 ml de H₂O. Misturar em vortex e centrifugar durante 5 minutos. Dissolver 4 g de sacarose livre de RNAse e DNase

em um volume final de 10 ml de TAE 1X. Adicionar solução saturada de bromofenol blue até atingir a cor azul intensa. Distribuir em alíquotas de 1 ml em tubos Eppendorf e armazenar em geladeira.

TBE 5X

Dissolver 30,9 g de Ácido Bórico, 121,1 g de Trizma-Base e 3,73 g de EDTA dissódico em 600 ml de H₂O. Completar o volume para 1.000ml.

Tris 1M

Dissolver 121,1 g de Trizma-Base em 800 ml de H₂O. Ajustar o pH para o valor desejado, adicionando-se ácido clorídrico concentrado:

pH	HCl
7,4	70 ml
7,6	60 ml
8,0	42 ml

Deixar a solução esfriar e proceder o ajuste final do pH. Completar o volume para 1.000 ml. Esterilizar por autoclavagem.

Preparação de Fenol Equilibrado com Tris

Liquefazer o fenol bidestilado em banho-maria 68°C. Adicionar um igual volume de Tris-HCl 0,5 M pH 8,0. Mistu-

rar com o auxílio de agitador magnético durante 15 minutos à temperatura ambiente. Paralisar a agitação e manter a solução imóvel até a separação das duas fases (geralmente durante a noite). Retirar a fase aquosa (superior) por aspiração com uma seringa.

Adicionar um volume igual de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Misturar durante 15 minutos. Esperar a separação das fases e remover a fase aquosa. Repetir as extrações com tampão até que o pH da fase fenólica, medida com papel indicador, seja superior a 7,8.

Quando as fases encontrarem-se equilibradas, remover a fase aquosa e adicionar 0,1 volumes de Tris.HCl 0,1 M pH 8,0, contendo 0,2% de βME. O fenol deverá ser armazenado em frasco envolto em papel alumínio. Manter em geladeira.

Meios de Cultura

Meio LB (Meio Luria-Bertani)

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O 800ml	
Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 2N.	
H ₂ O qsp	1.000 ml
Esterilizar por autoclavagem durante 20 minutos.	

**Meio LBM (Meio LB contendo
10 mM de Mg^{+2})**

Adicionar a 1.000 ml de meio LB
2,46 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Esterilizar por
autoclavagem durante 20 minutos.

Glicose 2M

Glicose	36 g
H ₂ O q sp	100 ml

Esterilizar por filtração.
Armazenar em geladeira.

Meio SOB

Bacto Tryptone	20 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	0.585 g
KCl	0,186 g
H ₂ O	800 ml

Ajustar o pH para 7,0 com KOH 1 N

H₂O qsp 1.000 ml

Adicionar 10 ml de uma Solução estéril contendo
1 M de $MgCl_2$ e 1 M de $MgSO_4$.

Solução de Mg^{+2}

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	20,3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	24,6 g
H ₂ O q sp	100 ml

Esterilizar por filtração em filtro 0,22 μ m.

Armazenar a -20°C.

Meio SOC

Adicionar ao meio SOB glicose su-
ficiente para obter-se uma concentração
final de 20 mM de glicose. Para 1.000 ml
de meio SOB adicionar 10 ml de glicose
2 M estéril.

RESULTADOS

Avaliação de Ocorrência de Polimorfismo de Restrição entre o Somaclone S1587 e a Linhagem Cat-100-6

Com a finalidade de observar a ocorrência de alterações moleculares no somaclone S1587, decidiu-se por comparar o padrão dos fragmentos de restrição dos genes de α -zeínas de 22 KDa na linhagem original (Cat-100-6) e geração R1 do somaclone S1587.

Neste experimento, amostras de 10 μ g de DNA da linhagem original e DNA extraído de um pool de 200 progênies da geração R1 do somaclone foram digeridas com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III. Também foram digeridas com Eco RI amostras de DNA do plasmídeo recombinante pZ22.3, contendo quantidades equivalentes a 2, 5, 10 e 20 cópias do gene α -zeína de 22 KDa. Para o cálculo do número equivalente de cópias, foi utilizado o valor de $5,5 \times 10^6$ Kb para o tamanho do genoma haplóide do milho (Laurie & Bennett, 1985; Lara & Leite, 1995).

Os fragmentos obtidos foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%, e em seguida transferidos para membrana de nylon (Hybond-N, Amersham), conforme descrito em Materiais e Métodos. Posteriormente a membrana foi submetida à hibridação com uma sonda radioativa preparada a partir do inserto Pst I do plasmídeo pZ22.3 (Fig. 5A).

Após a revelação da autoradiografia, a membrana foi lavada para retirada da sonda, e a mesma foi submetida a hibridação com uma segunda sonda radioativa, neste caso específica para o gene *Adh-1* de milho, obtida através da digestão do plasmídeo pZML793 com a enzima de restrição Pst I.

A hibridação com a sonda de *Adh-1* foi realizada com a finalidade de titular as quantidades de DNAs das diferentes amostras. O gene *Adh-1* está representado por uma única cópia no genoma haplóide de milho, e a digestão com Hind III resulta em um fragmento de 2,3 Kb (Fig. 4). A hibridação com esta sonda resultou em bandas de 2,3 Kb, quando os DNAs foram digeridos com Pst I, de mesma intensidade para as amostras de DNA da linhagem original e

do somaclone (Fig. 5B). Indicando portanto a utilização de amostras contendo a mesma quantidade de DNA. As bandas obtidas nas amostras digeridas com Eco RI indicam a presença de dois alelos diferentes no somaclone. A linhagem original apresentou uma única banda de hibridação, enquanto que o somaclone apresentou duas bandas diferentes, e com intensidade reduzida aproximadamente pela metade.

A autoradiografia resultante da hibridação com a sonda específica de α -zeína de 22 KDa apresenta um padrão de múltiplas bandas com diferentes intensidades. Este resultado, aliado ao conhecimento prévio da ausência de sítios de restrição Eco RI e Hind III neste gene, comprovam o caráter multigênico da α -zeína de 22 KDa, também no somaclone.

Os diferentes padrões de tamanhos das bandas apresentados pelas duas amostras indicam polimorfismo gênico, enquanto que as diferentes intensidades apresentadas pelas bandas comuns às duas linhagens indicam, possivelmente, a presença de diferente número de cópias repetidas de forma reiterada.

Seleção de Plantas *Adh-0*

O grande número de mutações observado nas progênes de várias gerações do somaclone S1587, aliado ao caráter instável, e à presença de fenótipo variegado em algumas mutações, como por exemplo em folhas e sementes (Fig. 2), nos levou a supor tratar-se de uma ação de um elemento de transposição, possivelmente ativado durante o cultivo celular. Com a finalidade de testar esta hipótese decidimos isolar a versão mutada do gene *Adh-1* com o intuito de podermos identificar a origem da variabilidade observada no somaclone.

A seleção de plantas *adh-0* (Fig. 6) foi realizada conforme descrito em Materiais e Métodos. A Figura 7 mostra um exemplo de resultado de análise de atividade de ADH em sementes da geração R4.

A Figura 8 apresenta um exemplo típico de análise de atividade de ADH em grãos de pólen de plantas, classificadas genotipicamente como: *Adh/Adh*, *Adh/adh-0* e *adh-0/adh-0*.

A Tabela I apresenta os resultados obtidos na análise de grãos de pólen de plantas individuais, pertencentes à geração R5.

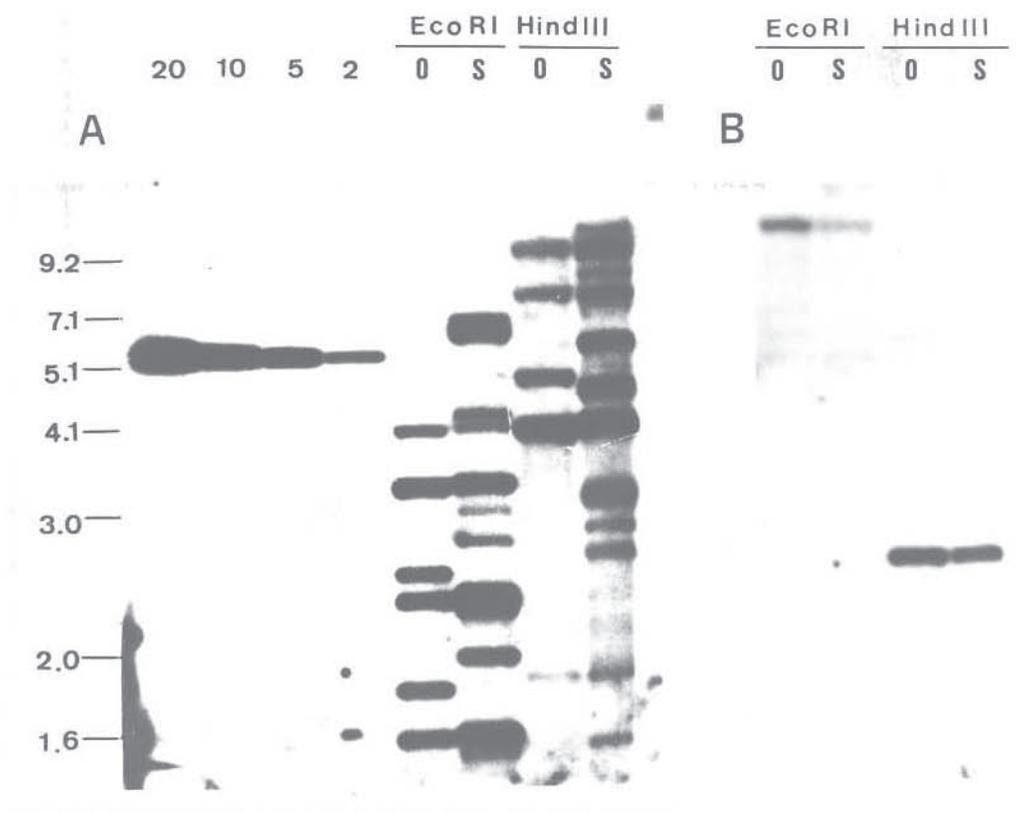


Figura 5: Análise, através de “Southern blot”, dos DNAs genômicos extraídos da linhagem original Cat-100-6 (O) e do somaclone S1587 (S). Amostras de 10 μ g de DNA foram digeridas com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III. A) Hibridação com o inserto Pst I do clone de cDNA de α -zeína de 22 KDa, pZ22.3 (Marks et al, 1985). Os números 20, 10, 5 e 2 indicam as amostras de do plasmídeo pZ22.3 digerido com a enzima de restrição Eco RI, contendo quantidades equivalentes de cópias do gene α -zeína de 22 KDa em 10 μ g de DNA genômico. B) O mesmo filtro hibridado com uma sonda preparada a partir do inserto Pst I do clone de cDNA de *Adh-1F* de milho pZML793 (Dennis *et al.*, 1984).



Figura 6: Espigas obtidas a partir da autopolinização de progênies R2 do Somaclone S1587. A primeira espiga, a esquerda, foi polinizada com grãos de pólen sem qualquer tratamento, enquanto que as demais resultam de polinização com grãos de pólen previamente tratados com álcool alílico, conforme descrito em Materiais e Métodos.

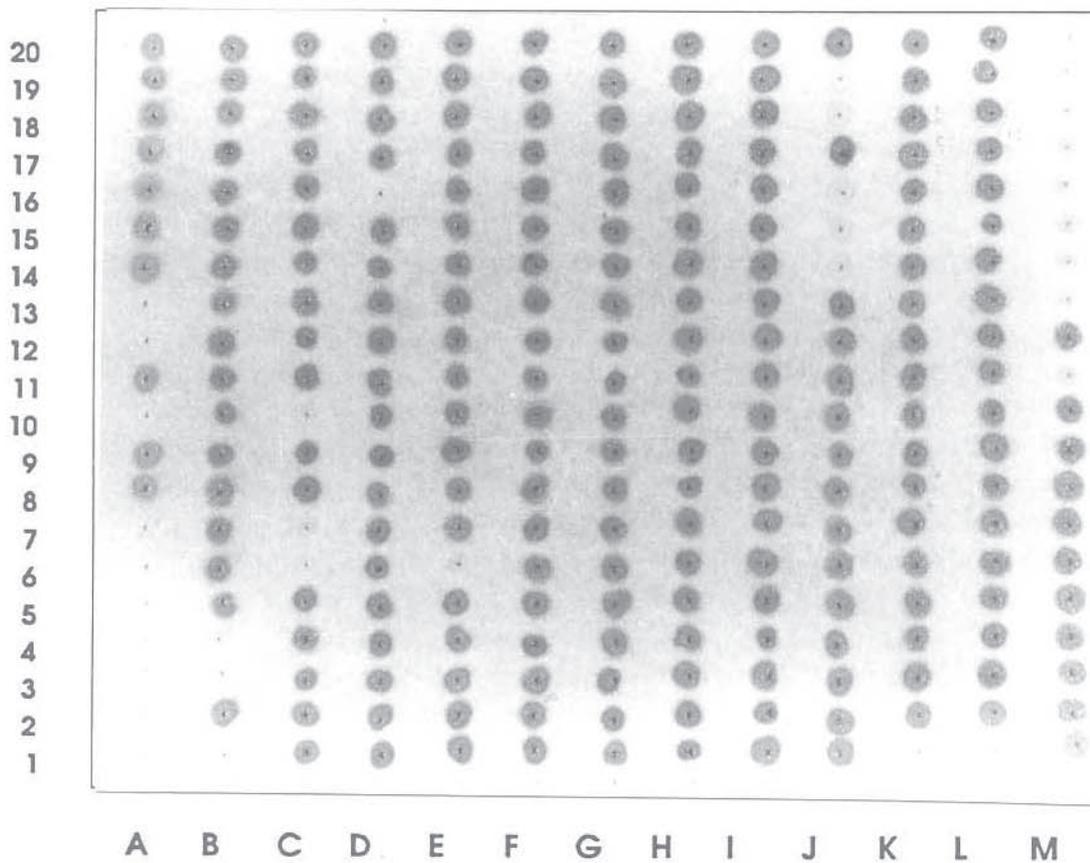


Figura 7: Exemplo de “Dot blot” utilizado no monitoramento para a atividade de ADH em sementes de plantas da geração R4, através de reação com cloreto de p-nitro-blue-tetrazolium. As diferentes colunas (A até M) representam amostras de escutelos, obtidos a partir de sementes R4, provenientes de uma única progênie R3. As linhas de 1 a 20 representam amostras de diferentes sementes de uma mesma espiga.

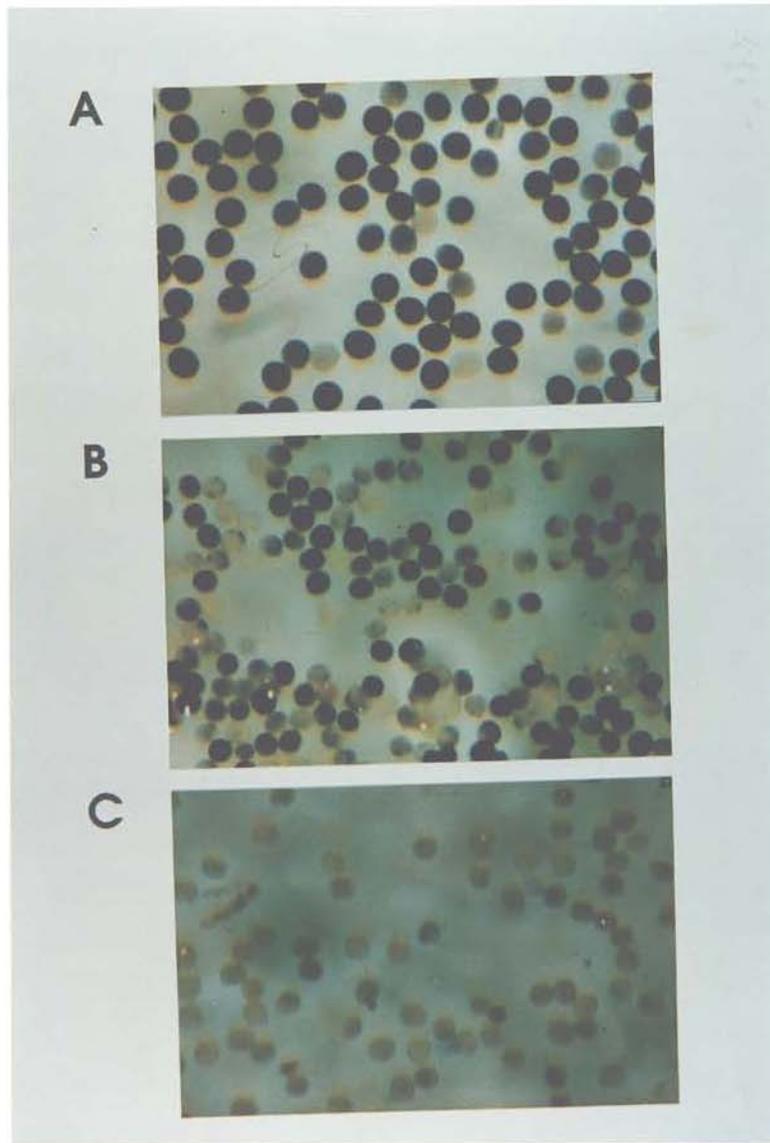


Figura 8: Resultado de uma análise de atividade de ADH, através de reação com p-nitro-blue-tetrazolium, em amostras de grãos de pólen de plantas da geração R5 do Somaclone S1587, as quais foram obtidas a partir da seleção de plantas ADH-0. A) planta homocigota *Adh/Adh*, B) planta heterocigota *Adh/adh-0*, C) planta homocigota *adh-0/adh-0*.

LINHA	PLANTA	GRÃOS DE PÓLEN COM ATIVIDADE DE ADH (%)	GERAÇÃO ANTERIOR
60	G	0%	P 3.7
61	A	100%	P 3.5
62	X	48%	P 3.1
62	A	0%	P 3.1
62	T	0%	P 3.1
62	M	0%	P 3.1
62	N	0%	P 3.1
62	P	0%	P 3.1
63	U	46%	P 3.3
63	T	100%	P 3.3
63	S	46%	P 3.3
63	R	0%	P 3.3
63	P	40%	P 3.3
63	A	0%	P 3.3
63	C	32%	P 3.3
64	D	37%	P 3.6
64	I	0%	P 3.6
65	S	100%	P 3.4
65	D	100%	P 3.4
66	A	44%	P 3.8
67	P	52%	P 3.2
67	H	53%	P 3.2

Tabela I: Resultados da análise da atividade de ADH em grãos de pólen de plantas individuais, pertencentes a geração R5.

Análise Molecular da Segregação do Alelo *adh-0* Através de “Southern Blot”

Baseados na avaliação da atividade de ADH dos grãos de pólen, foram preparados DNAs de plantas das linhas 65, 67 e 62, representativos dos genótipos *Adh/Adh*, *Adh/adh-0*, e *adh-0/adh-0*, respectivamente. Os DNAs foram extraídos de plantas individuais, a partir de espiguetas, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Amostras de 10 µg de DNA foram digeridas com a enzima de restrição Eco RI e Hind III, e em seguida os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos de DNA foram transferidos para uma membrana de nylon.

Como controle positivo para posterior hibridação, foi adicionada ao gel de agarose uma amostra do plasmídeo pZML793, linearizado com a enzima de restrição Eco RI.

O plasmídeo pZML793 corresponde a um clone de cDNA do gene *Adh-1F*, obtido por Denis *et al.*, (1984). A quantidade de DNA de pZML793 submetida à eletroforese (26 pg) foi equivalente a duas cópias do gene *Adh-1*.

As membranas resultantes das transferências foram submetidas à hibridação com uma sonda preparada a partir dos dois fragmentos resultantes da digestão do plasmídeo pZML793 com a enzima de restrição Pst I.

A Figura 9 apresenta o resultado da hibridação dos fragmentos de Eco RI. O resultado demonstra a presença de bandas únicas de aproximadamente 10 e 12 Kb nas amostras de DNA das linhas 65 e 62, respectivamente (Fig. 9, canaletas 2, 3). Sabendo-se que as linhas 65 e 62 apresentaram homozigose, respectivamente para os alelos *Adh* e *adh-0*, podemos associar a presença da banda de 10 Kb ao alelo *Adh*, e a banda de 12 Kb ao alelo *adh-0*. Este fato foi comprovado através da presença das duas bandas na amostra de DNA da linha 67 (Fig. 9, canaleta 4), classificada segundo o teste de atividade de ADH em grãos de pólen com o genótipo heterozigoto.

Resultado semelhante foi obtido com as mesmas amostras digeridas com a enzima de restrição Hind III (Figura 10). Os genótipos das linhas 65 e 62, além de apresentarem as bandas de 2,3 e 3,8 Kb, apresentaram também bandas distintas de tamanhos aproximados de 6,6 e 7,9 Kb, respectivamente (Fig. 10, canaletas 2 e 3). A linha 67

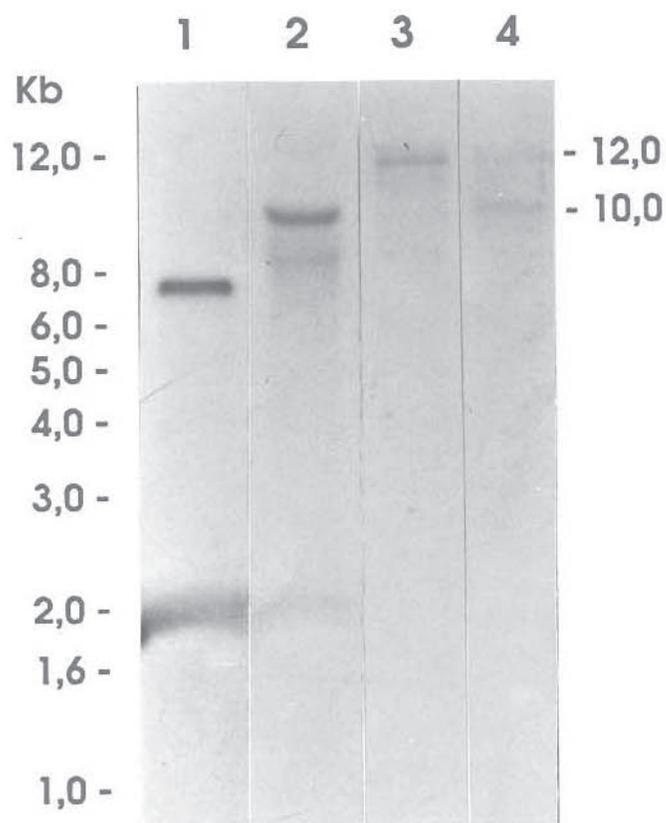


Figura 9: “Southern blot” de amostras de 10 μ g de DNA de plantas das linhas 65 (*Adh/Adh*), 62 (*adh-0/adh-0*), e 67 (*Adh/adh-0*), digeridas com a enzima de restrição Eco RI, respectivamente nas canaletas 2, 3 e 4. A canaleta 1 contém 26 pg de DNA de pZML793 linearizado com a enzima de restrição Eco RI, correspondendo a uma quantidade equivalente a duas cópias do gene *Adh-1*. A hibridação foi realizada com uma sonda preparada com o inserto Pst I do clone de cDNA de *Adh-1F* de milho pZML793 (Dennis *et al.*, 1984).

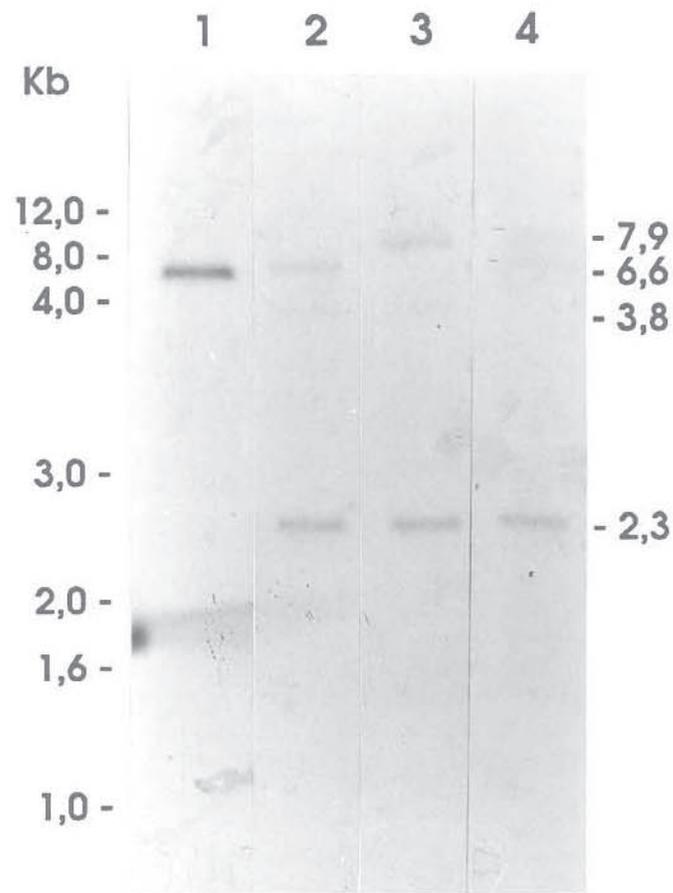


Figura 10: “Southern blot” de amostras de 10 μ g de DNA de plantas das linhas 65 (*Adh/Adh*), 62 (*adh-0/adh-0*), e 67 (*Adh/adh-0*), digeridas com a enzima de restrição *Hind* III, respectivamente nas canaletas 2, 3 e 4. A canaleta 1 contém 26 pg de DNA de pZML793 linearizado com a enzima de restrição *Eco* RI, correspondendo a uma quantidade equivalente a duas cópias do gene *Adh-1*. A hibridação foi realizada com uma sonda preparada com o inserto *Pst* I do clone de cDNA de *Adh-1F* de milho pZML793 (Dennis *et al.*, 1984).

apresentou o padrão esperado para o genótipo heterozigoto, isto é, apresentou além das bandas de 2,3 e 3,8 Kb, as duas bandas correspondentes aos alelos individuais (Fig. 10, canaleta 4).

As diferentes intensidades de hibridação deve-se ao fato de que estes fragmentos apresentam extensões variáveis de similaridade em relação ao cDNA de *Adh-1F*, o qual foi utilizado como sonda. O fragmento de 2,3 Kb (Fig. 2, fragmento 2) que apresentou maior intensidade de hibridação, compreende a maioria dos “exons”, enquanto que o fragmento de 3,8 Kb (Fig. 12, fragmento 1), inclui apenas o primeiro “exon”, o qual apresenta menor extensão.

Isolamento do Alelo *adh-0*

O isolamento do alelo *adh-0* foi realizado através da seleção de clones recombinantes do gene de *Adh-1*, a partir de uma biblioteca genômica preparada com DNA isolado da linha 62, homozigota para este alelo.

A biblioteca genômica foi construída em bacteriófago λ DASH, conforme descrito anteriormente em Materiais e Métodos.

A qualidade da biblioteca foi inicialmente avaliada através da infecção das

bactérias hospedeiras SRB e SRB(P2) (Apêndice I).

A infecção das hospedeiras SRB e SRB(P2) com uma determinada alíquota da biblioteca resultaram, respectivamente, em 388 e 352 placas de lise. Este resultado indicou portanto, que aproximadamente 91% do fagos testados poderiam ser considerados recombinantes.

A seleção de recombinantes apresentando sequências homólogas ao gene de *Adh-1* foi realizada em 25 placas de Petri de 135 mm, contendo cada uma aproximadamente 30.000 fagos. Foram utilizados como sonda os fragmentos Pst I do plasmídeo pZML793, marcados radioativamente.

A autoradiografia das membranas submetidas à hibridação revelou a presença de 20 possíveis recombinantes homólogos ao gene *Adh-1*. Dezoito destes clones foram posteriormente submetidos a uma segunda etapa de seleção, que resultou na confirmação de apenas dois dos clones analisados. Estes dois clones recombinantes foram ainda confirmados em um terceiro ciclo de hibridação e receberam os nomes de Adh1-5.1 e Adh1-7.2.

As Figuras 11A e 12A mostram as análises de restrição dos dois clones. Após a transferência para filtros de nylon as

amostras foram submetidas a hibridação contra uma sonda preparada, a partir do inserto Pst I do clone de cDNA de *Adh-1F* de milho, pZML793 (Dennis *et al.*, 1984).

As Figuras 11B e 12B mostram os resultados obtidos na hibridação. Estas análises demonstraram que os dois clones isolados apresentam diferentes padrões de restrição e hibridação.

Caracterização do Clone Adh1-5.1

A digestão do clone Adh1-5.1 com a enzima de restrição Eco RI (Fig. 11A, canaleta 3) resultou em 5 bandas, sendo que as bandas de 9 e 20 Kb, correspondem aos braços do fago λ DASH (Apêndice II), enquanto que as 3 bandas restantes de aproximadamente 2,2, 2,5 e 7,5 Kb, compreendem o inserto clonado. A partir deste resultado, podemos concluir que este clone apresenta uma inserção de aproximadamente 12 Kb. Dentre as bandas descritas, a única que apresentou capacidade de hibridar com a sonda do gene *Adh-1F* foi a banda de 7,5 Kb (Fig. 11B, canaleta 3).

A digestão do clone Adh1-5.1 com Hind III resultou em 6 bandas (Fig. 11A, canaleta 6), das quais 3 hibridaram com a sonda de *Adh-1F*: banda A de ~11 Kb, banda C de ~3,8 Kb, e banda D de 2,3 Kb (Fig.

11B, canaleta 6). As bandas C e D foram posteriormente subclonadas em pBluescript KS⁺, sendo que os subclones receberam, respectivamente, os nomes de 5.1HC e 5.1HD.

Os insertos foram parcialmente sequenciados conforme descrito em Materiais e Métodos. As sequências obtidas apresentaram homologia com a sequência descrita para o gene *Adh-1F* (Bennetzen *et al.*, 1984). A Figura 12 apresenta a localização destes clones em relação a sequência descrita para o gene *Adh-1F*.

Conforme mostra a Figura 12, a partir dos subclones obtidos com Hind III, foram preparados os subclones 5.1HP2, 5.1P, e 5.1P, os quais encontram-se também parcial ou totalmente sequenciados. Para cobrir a região 3' não codificadora do gene *Adh-1*, foi preparado o subclone 5.1HP1, posteriormente totalmente sequenciado.

As sequências obtidas de todos os clones apresentaram identidade total com o gene de *Adh-1F*.

Caracterização do Clone Adh1-7.2

A digestão do clone Adh1-7.2 com a enzima de restrição Eco RI, conforme mostra a Figura 13 (canaleta 2), resultou aparentemente em três bandas de tamanhos

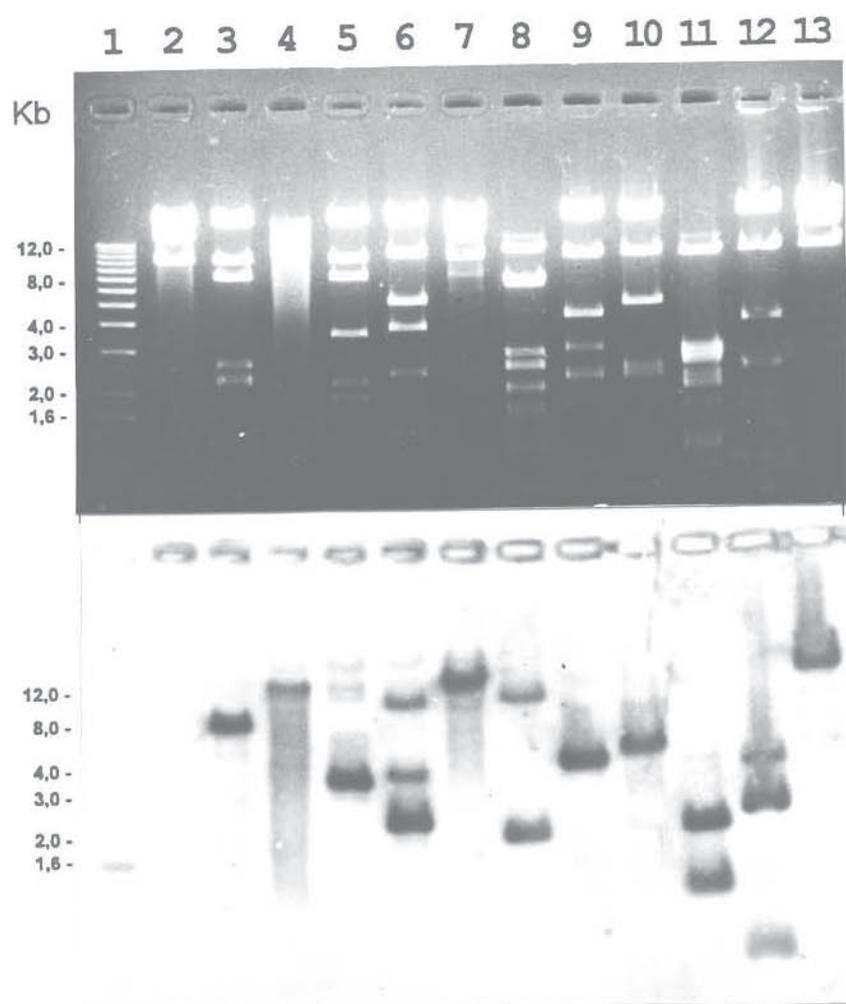


Figura 11: Análise de restrição do clone genômico Adh1-5.1. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,6% de amostras de 3 μ g de DNA do clone genômico, digeridas com as enzimas de restrição Eco RI (3), Bam HI (4), Xba I (5), Hind III (6), Xho I (7), Pst I (8), Eco RI/Bam HI (9), Eco RI/Xho I (10), Eco RI/Pst I (11), Eco RI/Hind III (12), Bam HI/Xho I (13). As canaletas 1 e 2 correspondem, respectivamente, aos padrões de tamanhos Ladder (BRL), e fago λ EMBL4 digerido com Eco RI. (B) Após a transferência para membrana de nylon, as amostras foram hibridadas com sonda não radioativa preparada, a partir do inserto Pst I do clone de cDNA de *Adh-IF* de milho pZML793 (Dennis *et al.*, 1984). O tempo de exposição da membrana foi de 1 hora.

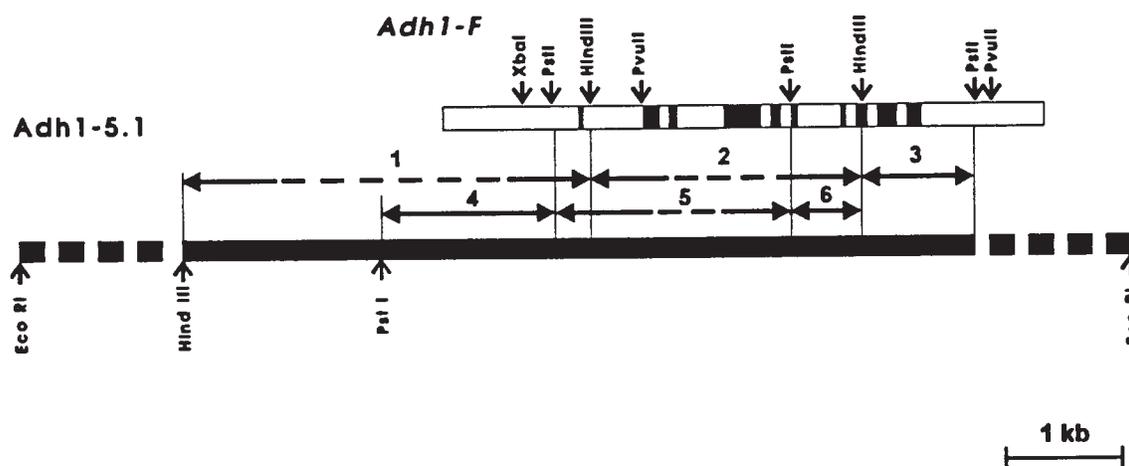


Figura 12: Mapas de restrição dos clones genômicos de *Adh-1F* e *Adh1-5.1*. As áreas hachuradas, na representação esquemática do gene *Adh-1F*, representam os “exons” presentes no gene. O clone genômico *Adh1-5.1* está representado pelo inserto de aproximadamente 12,5 kb, obtido pela digestão do fago com a enzima de restrição *Eco RI*. Estão indicados os subclones, 5.1HC (1, ~3,8 kb), 5.1HD (2, 2,3 kb), 5.1HP1 (3, 957 pb), 5.1P2 (4, ~1,5 kb), 5.1P (5, 2,1 kb), 5.1PH (6, 641 pb). Os subclones indicados por setas contínuas encontram-se integralmente sequenciados, enquanto que os subclones representados por setas descontínuas, foram parcialmente sequenciados.

9, 12 e 3,2 Kb. As bandas de 9 e 12 Kb, correspondem aos braços do fago λ DASH (Apêndice II). Apenas a presença da banda de 3,2 Kb no inserto do clone Adh1-7.2 seria incapaz de permitir o empacotamento do fago. A substituição das regiões *red* e *gam* do vetor λ DASH produz partículas fágicas viáveis somente quando os insertos apresentam tamanhos variando de 9 a 23 Kb (Apêndice II). Podemos portanto, inferir a existência de um quarto fragmento resultante da digestão com Eco RI, porém de tamanho similar ao braço do fago de 9 Kb.

Talvez, devido à grande similaridade dos tamanhos, géis contendo concentrações menores de agarose foram incapazes de separar o restante do inserto do braço do fago. Portanto, podemos assumir que o clone Adh1-7.2 apresenta um inserto de tamanho aproximadamente de 12 Kb.

Dentre os fragmentos obtidos após a digestão com Eco RI, o único que hibridou com a sonda de *Adh-1F* foi o fragmento de 3,2 Kb (Figura 13B, canaleta 2). Indicando, portanto, ser a única região do inserto clonado a incluir sequências similares a da sonda.

O fragmento Eco RI de 3,2 Kb foi subclonado em pBluescript KS⁺ (clone

pBE7.2E), que foi parcialmente sequenciado, com ajuda de sucessivas subclonagens, e também através de deleções unidirecionais com Exonuclease III, conforme descrito em Materiais e Métodos. Através destes expedientes foram sequenciados 2.100 pb a partir de uma das extremidades, e 309 pb a partir da extremidade oposta (Fig. 14).

Conforme representado na Figura 14 a região central do clone pBE7.2 apresentou identidade com os dois últimos exons e com a região 3' não codificadora do gene *Adh-1F*. Porém, a região contendo sequências similares ao penúltimo exon (exon 9) foi interrompida com sequências dissimilares em relação ao gene *Adh-1F*.

A sequência dissimilar encontrada interrompendo o exon 9 foi utilizada em uma busca de sequências similares no banco de dados GENBANK. Várias sequências similares foram encontradas, porém apenas duas apresentaram similaridade superior a 50%. A de maior similaridade (81,8%) correspondente a região distal da sequência 5' não codificadora do gene ZMPMS2 KDa (EMBL X58700), que codifica um polipeptídeo da família das α -zeínas de 19 KDa, e o de menor similaridade (58,4%), correspondente a região distal da sequência 5' não codificadora do gene MZEALPTUB

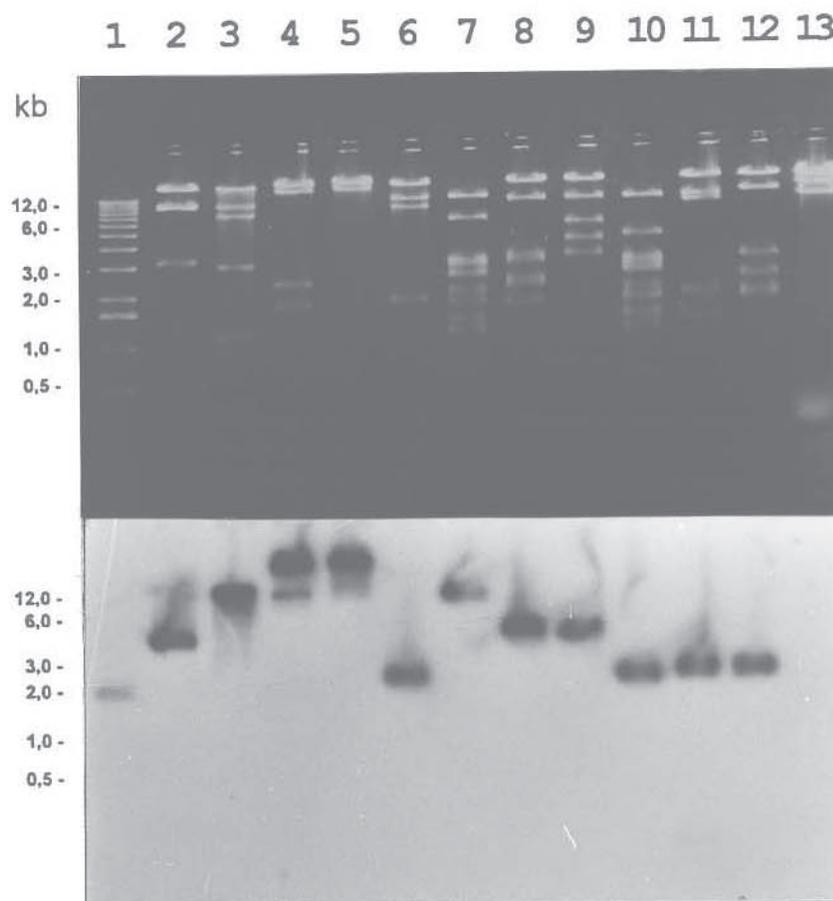


Figura 13: Análise de restrição do clone genômico *Adh1-7.2*. **(A)** Eletroforese em gel de agarose 0,6% de amostras de 3 μ g de DNA do clone genômico, digeridas com as enzimas de restrição Eco RI (2), Xba I (3), Bam HI (4), Hind III (5), Xho I (6), Pst I (7), EcoRI/Bam HI (8), Eco RI/Hind III (9), Eco RI/Pst I (10), Eco RI/Xho I (11), Bam HI/Xho I (12). As canaletas 1 e 13 correspondem, respectivamente, aos padrões de tamanhos Ladder (BRL), e fago λ EMBL4 digerido com Eco RI. **(B)** Após a transferência para membrana de nylon, as amostras foram hibridadas com uma sonda não radioativa preparada a partir do inserto Pst I do clone de cDNA de *Adh-1F* de milho pZML793 (Dennis *et al.*, 1984). O tempo de exposição da membrana foi de 1 hora.

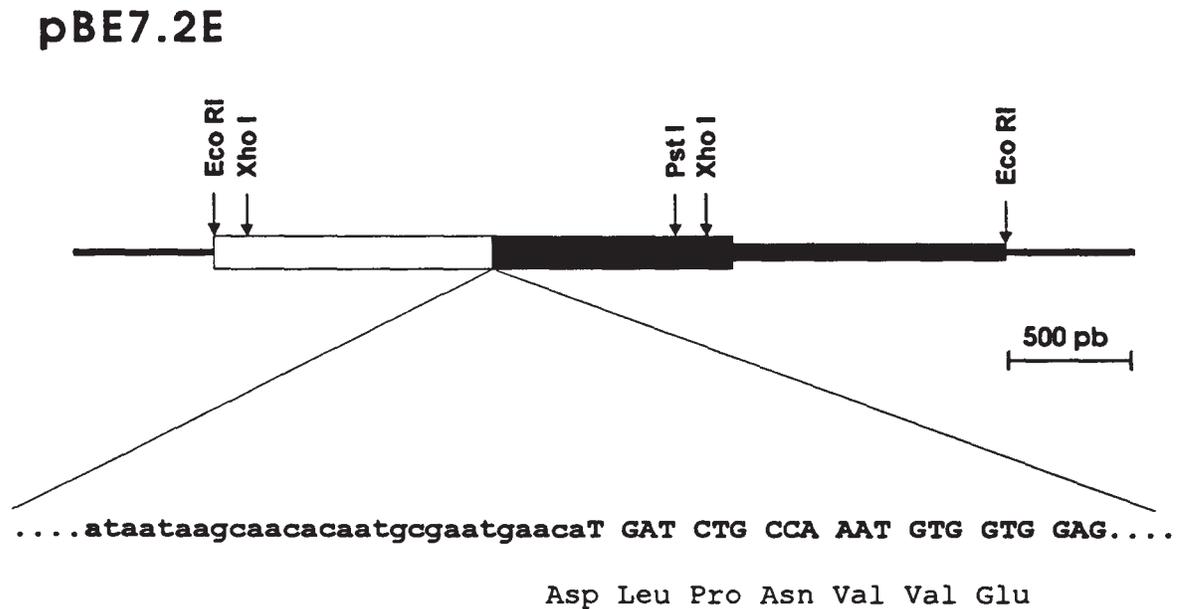


Figura 14: Representação esquemática do subclone pBE7.2E obtido da clonagem do inserto Eco RI de aproximadamente 3,2 kb no plasmídeo pBluescript KS⁺. A área indicada pelo retângulo maior representa a região sequenciada, sendo que a área hachurada representa a região que apresentou indentidade com a sequência do Exon 9 do gene *Adh-1F*. A sequência descreve o limite da região que apresenta identidade com a sequência do gene *Adh-1F*.

(EMBL X15704), que codifica α 1-tubulina de milho.

As Figuras 15 e 16 apresentam os alinhamentos da sequência responsável pela interrupção com os genes ZMPMS2 e MZEALPTUB, respectivamente.

Com relação ao clone Adh1-7.2 foi subclonado também o único fragmento produzido pela digestão com Pst I, contendo aproximadamente 6,0 Kb, com capacidade de hibridar com a sonda de *Adh-1F* (Fig. 13A e 13B). O sequenciamento parcial deste subclone denominado de pBE7.2P, demonstrou que este subclone contém parte da região representada pelo subclone pBE7.2E.

```

                60          70          80          90          100
pBE7.2E  TGGCTAGC-CACCGG--ACGATCCAGTGCTCCCAGACTCAGCAGATTCTTGGCTGCTCGA
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MZEPMS   AGCCTGGCACACCGGACACAGTCGGGTGCACCCAGACAGAGCTGACT-TTGGCTGAACAA
          1010      1020      1030      1040      1050      1060

                110      120      130      140      150      160
pBE7.2E  -GCCAAGACATTTTCAATTGGATTTTTCCTGTTTCCAGCACTTAGACACAATACATTAGT
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MZEPMS   GGCCATCTCTTTCCAATTGATTTCTCCTGTTTCCAGCACTAAGACACAATACATTAGT
          1070      1080      1090      1100      1110      1120

                170      180      190      200      210      220
pBE7.2E  CCATAAAACAATGTACTAAGTCTGAGAAACATACCTTTATCCTTGATTTGTACATTGTCC
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MZEPMS   CACTAAAACAATGTACTAAGTCTGAGAAACATACCTTTATACTTGATTTGTACTTTGTCC
          1130      1140      1150      1160      1170      1180

                230      240      250      260      270      280
pBE7.2E  ACCTTTTTTACACTTAGGCACCTTGTTGGACACTAAATCACCAAATACTTAGAAATGGC
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MZEPMS   ACCATTTGACACTTAGGCACCTTGTTGGACACTAGATCACCAAACACTTAGAAATGGC
          1190      1200      1210      1220      1230      1240

                290      300
pBE7.2E  CCAAGGGCACATTTCCCTTTCAA
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
MZEPMS   CCAACAACACATTTCCCTTTTCAG
          1250      1260

```

Figura 15: Alinhamento das sequências pBE7.2E e região distal da sequência 5' não codificadora do gene ZMPMS2 (EMBL X58700), que codifica α -zeína de 19KDa. O alinhamento das sequências resultou em 81,8% de identidade.

DISCUSSÃO

A observação do extenso número de mutações nas progênies, derivadas de uma única planta regenerada (S1587), sugere que, durante o período de cultura de tecido ocorreram múltiplas mutações, caracterizadas, devido ao seu caráter hereditário, como variação somaclonal.

A ocorrência de alterações moleculares foi pesquisada através da análise do padrão de restrição dos genes de α -zeínas de 22 KDa. As α -zeínas, correspondem a uma das classes de proteínas de reserva mais abundantes no endosperma de milho. As α -zeínas de 22 KDa são codificadas por uma família multigênica de aproximadamente 100 genes (Hagen & Rubenstein, 1981), localizados nos cromossomos 4 e 7 (Soave & Salamini, 1984). Assim sendo, o caráter multigênico deste gene nos permite analisar possíveis alterações em uma maior extensão do genoma.

A análise dos padrões de restrição dos genes de α -zeínas da linhagem original e do somaclone S1587 demonstra a ocorrência de um grande número de alterações moleculares (Fig. 5).

O conhecimento prévio da ausência de sítios para a enzima de restrição EcoRI em regiões estruturais dos genes de α -prolaminas (Larkin, 1981), nos permite deduzir a partir da comparação dos padrões de restrição com esta enzima, que o genoma do somaclone acumulou um grande número de mutações nas regiões correspondentes ou próximas aos genes de α -zeínas.

O padrão de restrição do DNA do somaclone mostra tanto o desaparecimento de bandas presentes na linhagem original, quanto o surgimento de novas bandas. Tais fatos podem ser explicados através de mutações que determinam a modificação, a eliminação ou o surgimento dos sítios alvos das enzimas de restrição, ou ainda através da completa deleção dos genes.

Devido ao fato de cada uma das bandas representar múltiplas cópias do gene, conforme atesta o experimento de reconstrução (Fig. 5), os padrões observados aparentemente resultam de mutações seguidas de homogeneização através de conversão gênica, ou ainda através de

“crossing-over” desigual durante processos de recombinações mitóticas.

A conversão gênica tem sido descrita como um dos principais mecanismos moleculares atuantes na homogeneização de genes repetidos em “tamden” (Kourilsky, 1986).

“Crossing over” mitótico tem sido descrito como responsável pela obtenção de mutantes recessivos homozigotos em plantas regeneradas em várias espécies (Smith, 1976; Evans, 1989).

A análise de restrição dos genes de α -zeínas indica também a ocorrência de alteração no número de cópias dos genes. Algumas bandas presentes no somaclone apresentam intensidade maiores que as bandas correspondentes na linhagem original (Fig. 5), indicando portanto a ocorrência de amplificação gênica durante o período de cultivo. Este fenômeno tem sido observado em plantas regeneradas de culturas de tecidos de outras espécies (Evans, 1989).

Na maioria das progênies do somaclone S1587, as mutações apresentaram segregação característica de genes recessivos ou dominantes, enquanto que, algumas poucas progênies apresentaram um grande desvio na segregação, sugerindo instabili-

dade. Tal observação indica a possibilidade de haver ocorrido ativação de sistemas de transposição durante o cultivo celular. Corroborando com esta hipótese, foram também observados fenótipos variegados característicos da atuação de transposons, tanto em sementes quanto em folhas (Fig. 2).

Para testar a hipótese da ativação de sistemas de transposição, durante o cultivo celular, realizamos a seleção de um gene alvo, possivelmente silenciado pelo suposto transposon.

A escolha do gene *Adh-1* deve-se a uma série de fatores, entre os quais citamos, a facilidade de seleção de plantas deficientes na atividade de ADH, a possibilidade do reconhecimento genotípico, através da análise da atividade em grãos de pólen, e o fato do gene *Adh-1* representar um dos genes de plantas melhor caracterizado.

Além disso, uma análise prévia de restrição de DNA de um pool de progênies da geração R1 do somaclone com a enzima de restrição Eco RI, indicou polimorfismo deste *locus* em relação a linhagem original (Fig. 5B). Na linhagem original a hibridação com a sonda de cDNA de *Adh-1F* de milho resultou em uma única

banda, enquanto que o pool de progênies do somaclone apresentou duas bandas.

Plantas deficientes na atividade de álcool desidrogenase (ADH-0) foram obtidas através da polinização de progênies R2 do somaclone S1587, com pólen da mesma progênie, tratado com álcool alílico. Conforme descrito em Materiais e Métodos, o tratamento com álcool alílico devido a citotoxicidade da acroleína (Fig. 1), produzida pela atividade da ADH, possibilita a eliminação dos grãos de pólen que apresentam atividade enzimática de ADH, permitindo portanto, a seleção do pólen deficiente naquela atividade (Fig. 6).

O teste para atividade da enzima ADH, através de "dot blot" (Fig.7) realizado na geração R4 permitiu a identificação de plantas homozigotas e heterozigotas.

As plantas homozigotas obtidas para o alelo *adh-0* da geração R4 e que não apresentaram atividade ADH foram plantadas, autopolinizadas, e tiveram o seu pólen analisado quanto a atividade de ADH.

Assim, foi possível selecionar plantas homozigotas na geração R5.

A análise da atividade de ADH dos grãos de pólen, devido ao conteúdo ha-

plóide de seu genoma, permite a identificação genotípica das plantas (Fig. 8). Desta maneira, foi possível identificarmos, dentre as plantas da geração R5, várias plantas heterozigotas *Adh/adh-0*, e homozigotas *Adh/Adh* e *adh-0/adh-0* (Tabela I). Baseados neste estudo optamos por realizar uma análise molecular da segregação do alelo *adh-0* em plantas das linhas 65, 67 e 62, representativas dos genótipos *Adh/Adh*, *Adh/adh-0* e *adh-0/adh-0*, respectivamente.

A análise molecular, através de "Southern blot" demonstrou a associação dos fragmentos Eco RI de 12 Kb, e Hind III de 7,9 Kb, com a presença do alelo *adh-0* nas amostras de DNA das plantas heterozigota (linha 67) e homozigota (linha 65) (Fig. 9 e Fig.10). Visto que a sonda utilizada na hibridação corresponde ao clone de cDNA de *Adh-1F* de milho, as bandas associadas ao alelo *adh-0*, representam obrigatoriamente regiões alteradas do gene *Adh-1*, ou muito próximas deste gene. Tais alterações podem ser explicadas através de mutações representadas por uma inserção, ou modificações de bases que determinaram alterações nos sítios alvos das enzimas de restrição.

Com a finalidade de esclarecer a origem destas alterações, foi construída uma biblioteca genômica a partir de amostras de DNA de uma planta da linha 62. A partir desta biblioteca foram selecionados dois clones recombinantes, Adh1-5.1 e Adh1-7.2, contendo seqüências homólogas ao gene *Adh-1F*.

O clone recombinante Adh1-5.1 quando digerido com a enzima de restrição Eco RI resultou em uma banda de aproximadamente 12 Kb, capaz de hibridar com a sonda de *Adh-1F* (Fig. 11A e 11B). Apesar deste inserto apresentar o mesmo tamanho da banda associada ao alelo *adh-0*, não podemos descartar a possibilidade de que os sítios de Eco RI deste fragmento sejam originários do vetor λ DASH (Apêndice II). Aproximadamente 3.000 pb deste clone foram sequenciados (Fig. 12), e as seqüências obtidas apresentaram completa identidade com o gene *Adh-1F*.

O clone recombinante Adh1-7.2, quando digerido com a enzima de restrição Eco RI, resultou em uma única banda capaz de hibridar com a sonda de *Adh-1F*, contendo 3,2 Kb (Fig 13A e 13B). Esta banda foi subclonada (subclone pBE7.2E), e posteriormente parcialmente sequencia-

da. A região central do subclone apresentou identidade com os dois últimos exons e com a região 3' não codificadora do gene *Adh-1F*. No entanto, a região contendo seqüências similares ao penúltimo exon (exon 9) foi interrompida com seqüências dissimilares (Fig. 14). Uma busca de seqüências similares à encontrada interrompendo o exon de *Adh-1F* no banco de dados GENBANK, resultou em duas seqüências que apresentaram similaridade superior a 50%. As duas seqüências correspondem a regiões distais 5' não codificadoras dos genes que codificam α -zeínas de 19 KDa (81,8% de similaridade), e α 1-tubulina de milho (58,4% de similaridade).

A posição distal das seqüências em relação às regiões estruturais dos genes, aliada ao alto conteúdo de AT (superior a 60%), indicam tratar-se de seqüências correspondentes a regiões intergênicas.

Apesar do inserto do clone Adh1-7.2 apresentar um inserto de aproximadamente 12 Kb, apenas a região compreendida pelo subclone pBE7.2E apresentou similaridade com a seqüência do gene *Adh-1F*. A ausência de seqüências similares à região 5' do gene *Adh-1F*, não nos permitiu identificar a seqüência interruptora do exon 9, como responsável pela alteração do gene

no alelo *adh-0* identificado nas plantas da linha 62.

O caráter homozigoto apresentado pela linha 62 (Tabela I, Fig. 9 e Fig. 10) somado a ausência de uma banda de 3,2 Kb, apresentando similaridade com o gene *Adh-1F*, entre os produtos da digestão do DNA genômico de plantas da linha 62 com a enzima de restrição Eco RI (Fig. 9), indica que o clone Adh1-7.2, muito provavelmente, apresenta-se como sendo um artefato de clonagem.

Este artefato poderia ter sido originado, durante o processo de clonagem, através da ligação do fragmento contendo a região do gene *Adh* com um fragmento qualquer de DNA, resultando em um fragmento de DNA com um tamanho mínimo necessário para permitir o empacotamento no bacteriófago.

Corroborar também com esta hipótese o fato da região que interrompe o gene constituir-se, provavelmente de uma sequência repetitiva, e portanto, mais abundante na mistura de fragmentos. O caráter repetitivo desta sequência interruptora é evidenciado pelo fato de se encontrar presente na região distal 5' não codificadora de pelo menos dois genes depositados em

bancos de dados de sequências (Fig. 14 e Fig. 15).

Os resultados obtidos indicam portanto que o clone Adh1-5.1 representa o alelo *adh-0*. Apesar de não ter sido identificado, podemos presumir, que a alteração que determina a ausência de atividade de ADH, encontra-se nas regiões não sequenciadas do clone em questão. Este clone apresenta um mapa de restrição similar ao descrito para o gene *Adh-1F*, o que determina a exclusão de possíveis inserções como responsáveis pela alteração do gene. Esta constatação elimina, portanto a hipótese de silenciamento do gene *Adh-1*, através da ação de transposons. Assim sendo, a alteração poderia estar representada por uma pequena mutação capaz de alterar a fase de leitura do RNA mensageiro, capaz de determinar a inativação enzimática. Ou ainda estar representada por mutações capazes de produzir modificações no sítio ativo da enzima que determinassem sua inativação.

CONCLUSÕES

A análise dos padrões de restrição do Somaclone S1587 demonstrou um extenso polimorfismo para os genes de α -prolaminas. Esta mesma análise indicou ainda a presença de dois diferentes alelos para o gene *Adh-1*.

Foram isolados dois clones recombinantes (*Adh1-5.1* e *Adh1-7.2*) a partir de uma biblioteca genômica, preparada com DNA de uma linha homozigota para o alelo *adh-0* (Linha 62).

O clone *Adh1-7.2* apresentou uma interrupção do gene *Adh-1*, através de uma inserção no "exon" 9. Entretanto os resultados de hibridação dos DNAs do clone e genômico da Linha 62 com uma sonda de cDNA de *Adh-IF*, indicam que este clone possivelmente tenha sido resultado de um artefato durante o processo de clonagem.

O clone *Adh1-5.1* foi parcialmente sequenciado, não sendo encontradas inserções. As hibridações com DNA do clone *Adh1-5.1*, bem como seu sequenci-

amento parcial demonstraram ausência de inserções no gene *Adh-1*. Eliminando definitivamente a hipótese de silenciamento do gene *Adh-1*, através da ação de Sistemas de Transposição.

Desta forma podemos presumir que a alteração responsável pelo processo de silenciamento do gene *Adh-1* poderia estar representada por mutações pontuais, presentes em regiões não cobertas pelo sequenciamento, capazes de alterar a fase de leitura do mRNA ou ainda produzir modificações no sítio ativo da enzima.

SUMÁRIO

Entre as possíveis causas para a ocorrência da Variação Somaclonal, encontram-se: alterações do número e da morfologia dos cromossomos, rearranjos cromossômicos, tais como, recombinação mitótica, e cabe-nos destacar ainda a ativação de elementos de transposição, durante a cultura *in vitro*.

A partir destes dados, e com a ocorrência de um variante somaclonal de milho (*Zea mays L.*) no Laboratório de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, da UNICAMP, optamos pela identificação e caracterização de um mutante para o gene *Adh-1* identificado neste mesmo variante somaclonal.

Este variante somaclonal, denominado Somaclone (S1587), o qual foi obtido a partir de calos embriogênicos da Linhagem Cat-100-6 de milho, destacou-se das demais plantas por seu vigor, perfilhamento e alta prolificidade. Somando-se a estas características, a análise posterior de suas progênes revelou um

grande número de mutações em sementes e plântulas.

Paralelamente à observação destas mutações, a ocorrência de alterações moleculares foi analisada para o padrão de restrição de α -zeínas de 22 KDa, as quais são codificadas por uma família multigênica de aproximadamente 100 genes localizados nos cromossomos 4 e 7.

Uma vez que a enzima de restrição Eco RI não contém sítios na região estrutural dos genes de α -prolamina, a comparação de padrões de restrição do somaclone com a linhagem original Cat-100-6 mostrou que o mesmo acumulou um grande número de mutações nas regiões correspondentes ou próximas aos genes de α -zeínas.

A constatação de alterações moleculares, e a presença de mutações de natureza instável em progênes deste somaclone, nos permitiram propor como resposta a tais alterações uma possível ação de sistemas de transposição. Esta

hipótese foi testada através do estudo do gene *Adh-1*.

A escolha do gene *Adh-1* deve-se ao fato deste consistir de um dos genes de plantas melhor caracterizado, e somando-se a esse fato, a grande facilidade de seleção de plantas deficientes na atividade de ADH. Desta forma, estes fatos possibilitaram o seu reconhecimento geotípico, através testes de atividade de ADH em grãos de pólen.

Foram avaliadas plantas derivadas do somaclone S1587 até a geração R5, e somente então obtivemos plantas heterozigotas *Adh/adh-0*, e homozigotas *Adh/Adh* e *adh-0/adh-0*.

Através de experimentos de "Southern blot", utilizando o clone de cDNA de *Adh-1F* (pZML 793) como sonda para hibridação, observou-se a associação de fragmentos Eco RI de 12Kb e Hind III de 7,9 Kb com a presença do alelo *adh-0* nas amostras de DNA das plantas homozigota e heterozigota, representando-se desta forma, possíveis regiões alteradas do gene *Adh-1*, ou regiões muito próximas a este gene.

A partir da constatação de tais alterações, foi construída uma Biblioteca

Genômica, onde foram selecionados dois clones denominados Adh1-5.1 e Adh1-7.2.

Estes clones, quando digeridos com a enzima de restrição Eco RI apresentaram como resultados, uma banda de aproximadamente 12 Kb para o clone Adh1-5.1, e uma banda de aproximadamente 3,2 Kb para o clone Adh1-7.2

Após os experimentos de clonagem e posterior sequenciamento, as sequências obtidas do clone Adh1-5.1 apresentaram completa identidade com o gene *Adh-1F*.

Quanto ao clone Adh1-7.2, a região central deste clone apresentou identidade com os dois últimos exons e a região 3' não codificadora do gene *Adh-1F*. Porém a região com sequências similares ao exon 9 foi interrompida com sequências que apresentam similaridade com regiões distais da sequência 5' não codificadora dos genes ZMPMS2, o qual codifica um polipeptídeo da família das α -zeínas de 19 KDa e MZEALPTUB, o qual codifica α -tubulina de milho.

Somando-se a estes resultados, a ausência de sequências similares à região 5' do gene *Adh-1F*, como também a ausência do fragmento Eco RI de 3,2 Kb,

apresentando similaridade com o gene *Adh-1F*, acreditamos que o clone Adh1-7.2, trata-se de um artefato de clonagem.

Finalizando os trabalhos, podemos presumir que o clone Adh1-5.1 trata-se do alelo *adh-0*, uma vez que este apresenta ainda um mapa de restrição similar ao descrito para o gene *Adh-1*, somando-se ainda o fato de que não foram detectadas inserções neste mesmo gene, estes fatos seriam suficientes para eliminar a hipótese de silenciamento do gene *Adh-1*, através de sistemas de transposição.

Desta forma podemos ainda presumir que a alteração responsável pelo processo do silenciamento do gene *Adh-1* poderia estar representada por mutações pontuais, presentes em regiões não cobertas pelo sequenciamento, capazes de alterar a fase de leitura do mRNA ou ainda produzir modificações no sítio ativo da enzima.

SUMMARY

Among the possible several forms for occurrence of somaclonal variation, we can mention alterations in the number and morphology of chromosomes, mitotic recombination and transposable elements activation during the process of "in vitro" culture.

Based on the above informations and on the existence of a Somaclonal Variant identified in the Plant Molecular Biology Laboratory, UNICAMP, we decided to identify a mutant of *adh-1* locus in the maize somaclonal variant (S1587).

This somaclonal variant (S1587) was obtained from embryogenic callus of the maize inbred line Cat-100-6 and presented vigor, tillering and high proliferative capacity.

Besides these characteristics, further analysis of progenies showed a large number of mutations in the seeds and seedlings.

Among the observed mutations analysed are those that occurred in the 22 KDa α -zeins, that are coded by a

multigenic family with 100 genes, located on maize chromosomes 4 and 7.

Since the restriction enzyme Eco RI does not have any site in the structural region of the α -prolamin genes, the comparison of the restriction pattern of the somaclone with the one of Cat-100-6 showed that a greater number of mutations accumulated in the α -zein genes or in the regions next to them.

Molecular alterations as well as the presence of unstable mutations in the somaclones progenies suggested the possible existence of a transposon. This hypothesis was tested by the study of a *Adh-1* mutant.

We have chosen the *Adh-1* gene because it is one of the best characterized plant genes, and it is easy to select plants deficient for the ADH activity. This makes the genotypic characterization easy by analysing pollen grains.

Plants originated from the Somaclone S1587, R1 to R5 generation were tested. And only after the R5 generation plants heterozygous

Adh/adh-0, and homozygous *Adh/Adh*, *adh-0/adh-0* were selected to study.

After molecular analysis using hybridization experiments and the cDNA, *Adh-1F* as a probe, we obtained Eco RI and Hind III fragments, 12 Kb and 7,9 Kb, respectively, that were associated with the presence of the *adh-0* allele in the DNA samples of homozygous and heterozygous plants. This indicated that regions in the *Adh-1* gene or near this gene were altered.

After the observation of those alterations, a genomic library was constructed and two clones denominated Adh1-5.1 and Adh1-7.2 were selected for further study.

When digested with Eco RI the clone Adh1-5.1 presented a 12 Kb band the clone Adh1-7.2 presented a 3,2 Kb band.

After sequencing experiments, the Adh1-5.1 clone showed a sequence that was identical to the *Adh-1F* gene.

However, the region with sequences similar to exon 9 was interrupted with sequences that presented similarity with distal regions of the 5' non-coding sequence of genes ZMPMS2 which encodes a polypeptide from the 19 KDa

α -zeins family and MZEALPTUB, which encodes a maize α -tubulin.

In addition the absence of sequences similar to the 5' region of the *Adh-1* gene and the absence of the 3,2 Kb band that presented similarity to the *Adh-1F* gene, made us believe that the Adh1-7.2 clone is the product of a cloning artifact.

We can presume that clone Adh1-5.1 is the *adh-0* allele, because this clone has a restriction map similar to the one described for the *Adh-1* gene.

Because no insertions were detected in this gene we can eliminate the hypothesis of the *Adh-1* gene being inactivated by a transposon.

We can presume that the alterations responsible for the inactivation of the *Adh-1* gene could be point mutations in the regions of the gene that were not sequenced.

Those mutations could have induced alterations in the reading frame of the mRNA or they could have induced modifications in the active site of the enzyme.

LITERATURA CITADA

- Alleman, M. & Freeling, M.** - Preliminary characterization of a derivative allele of an unstable regulatory mutant at ADH1. *Maize Genet. Coop. News.* 57: 156 - 157, 1983.
- Alleman, M. & Freeling, M.** - The *Mu* transposable elements of maize: evidence for transposition and copy number regulation during development. *Genetics* 112: 107 - 119, 1986.
- Armstrong, C.L. & Phillips, R.L.** - Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 70: 363 - 369, 1988.
- Arruda, P., Silva, M.J., Azevedo, R.A., Ottoboni, L.M.M., Leite, A.** - Tissue Culture of Maize. *Agricultural Biotechnology for Sustainable Productivity.* 1983
- Azevedo, R.A., Arana, J. L., Arruda, P.** - Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant Ltr1 with opaque-2 maize mutant. *Plant Sci* 70: 81 - 90, 1990.
- Azevedo, R.A. & Arruda, P.** - Dominant and recessive mutations conferring resistance to S-2-aminoethyl-L-cysteine in maize. *Plant Physiol* 145: 321 - 326, 1995.
- Baker, B., Schell, J., Lörz, H., Federoff, N.** - Transposition of the maize controlling element *Activator* in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4844 - 4848, 1986.
- Baker, B., Coupland, G., Federoff, N., Starlinger, P., Schell, J.** - Phenotypic assay for excision of the maize controlling element *Ac* in tobacco. *EMBO J.* 6: 1547 - 1554, 1987.
- Banks, J., Kingsbury, J., Raboy, V., Schiefelbein, J.W., Nelson, O.,**

- Federoff, N.** - The *Ac* and *Spm* controlling element families in maize. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 307 - 311, 1985.
- Barbier, M. & Dulieu, H.** - Early occurrence of genetic variants in protoplast cultures. *Plant Sci. Lett.* **29**: 201 - 206, 1983.
- Barker, R.F., Thompson, D.V., Talbot, D.R., Swanson, J., Bennetzen, J.L.** - Nucleotide sequence of the maize transposable element *Mu1*. *Nucleic Acids Res.* **12**: 5955 - 5967, 1984.
- Bayliss, M.W.** - Chromosomal variation in plant tissues in culture. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **11A**: 113 - 144, 1980.
- Bennetzen, J.L.** - Covalent DNA modification and the regulation of *Mutator* element transposition in maize. *Genetics* **208**: 45 - 51, 1987.
- Bennetzen, J. L., Swanson, J., Taylor, W.C., Freeling, M.** - DNA insertion in the first intron of maize *Adhl* affects message levels: cloning of progenitor and mutant *Adhl* alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4125 - 4128, 1984.
- Bennetzen, J.L., Springer, P.S., Cresse, A.D., Hendrickx, M.** - Specificity and regulation of the mutator transposable element system in maize. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **12**: 57 - 95, 1993.
- Bianchi, W.M. & Viotti, A.** - DNA methylation and tissue specific transcription of the storage protein genes of maize. *Plant Molecular Biology.* **11**: 203 - 214, 1988.
- Birchler, J.A.** - The cytogenetic localization of the alcoholdehydrogenase-1 locus in maize. *Genetics.* **94**: 687 - 700, 1980.
- Brettell, R.L.S., Dennis, E.S., Scowcroft, W.R., Peacock, J.** Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 235 - 239, 1986.
- Brown, P.T.H. & Lorz, H.** - Molecular changes and possible origins of somaclonal variation. In "Somaclonal variations and Crop

- Improvement". ed. J. Semal. 148 - 159. Boston, 1986.*
- Bukhari, A.I., Shapiro, J.A., Adhia, S.L.** - Eds: DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes. New York. *Cold Spring Harbor Laboratory. 1977.*
- Calos, M.P. & Miller, J.H.** - Transposable Elements. *Cell. 20:* 579 - 595, 1980.
- Cameron, J.R., Loh, E.Y., Davis, R.W.** - Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell. 16:* 739 - 752, 1979.
- Capy, P., Anxolabéhère, D., Langin, T.** - The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends in Genet. 10:* 7 - 12, 1994.
- Chaleff, D.T. & Fink, G.R.** - Genetic events associated with an insertion mutation in yeast. *Cell. 21:* 227 - 237, 1980.
- Chaleff, R.S.** - Isolation of Agronomically Useful Mutants from Plant Cell Cultures. *Science. 219:* 676 - 682, 1983.
- Chandler, V.L. & Walbot, V.** - DNA modification of maize transposable element correlates with loss of activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:* 1767 - 1771, 1986.
- Chandler, V.L., Rivin, C., Walbot, V.** - Stable non-mutator stocks of maize have sequences homologous to the *Mu1* transposable element. *Genetics. 114:* 1007 - 1021, 1986.
- Chen, E.J., & Seeburg, P.H.** - Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA. 4:* 165 - 170, 1985.
- Chomet, P.S., Wessler, S., Dellaporta, S.L.** - Inactivation of the maize transposable element *Activator (Ac)* is associated with its DNA modification. *EMBO J. 6:* 295 - 302, 1987.
- Cone, K., Burr, F. & Burr, B.** - Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:* 9631 - 9635, 1986.

- Dawe, R.K., Lachmansingh, A.R., Freeling, M.** - Transposon mediated mutations in the untranslated leader of maize Adh1 that increase and decrease pollen specific gene expression. *The Plant Cell*. Vol. 5: 311 - 319, 1993.
- De Klerk, G.J.** - How to measure Somaclonal Variation. *Acta Bot. Neerl.* 39(2): 129 - 144, 1990.
- De La Pena, A., Lorz, H., Schell, J.** - Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*. 325: 274 - 276, 1987.
- Dellaporta, S. & Moreno, M.A.** - Gene tagging with *Ac/Ds* elements in maize. In "*The maize handbook*", Freeling, M. & Walbot, V. eds, pg. 219 - 233, Springer-Verlag, New York, Inc., 1994.
- Dennis, E.S. & Brettell, R.I.S.** - DNA methylation of maize transposable elements is correlated with activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 326: 217 - 229, 1980.
- Dennis, E.S., Gerlach, W.L., Pryor, A.L., Bennetzen, J.L., Inglis, A., Llewellyn, D., Sachs, M.M., Ferri, R.I.** - Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase (Adh 1) gene of maize. *Nucl. Acids. Res.* 12: 3983 - 4000, 1984.
- Dennis, E.S., Sachs, M.M., Gerlach, W.L., Finnegan, E.J., Peacock, W.J.** - Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase (Adh1) gene of maize. *Nucl. Acids Res.* 13: 727 - 743, 1985.
- Dennis, E.S., & Brettell, R.I.S.** - DNA methylation of maize transposable elements is correlated with activity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 326: 217 - 229, 1990.
- Dolézal, J. & Novak, F.J.** Effect of plant tissue frequency of somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. *Z. Pflanzenphysiol.* 114: 51 - 58, 1984.
- Donn, G., Tischer, E., Smith, J.A., Goodman, H.M.** - Herbicide - resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 621 - 635, 1984.

- Dooner, H.K., Weck, E., Adams, S., Ralston, E., Favreau, M. - A molecular genetic analysis of insertions in the bronze locus in maize. *Mol. Gen. Genet.* 200: 240 - 246, 1985.
- Dooner, H., English, J., Ralston, E., Weck, E. - A single genetic unit specifies two transposition functions in the maize element *Activator*. *Science* 234: 210 - 211, 1986.
- Doolittle, W.F. & Sapienza, C. - Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*. 284: 601 - 603, 1980.
- Döring, H.-P., Tillmann, E., Starlinger, P. - DNA sequence of the maize transposable element *Dissociation*. *Nature*. 307: 127 - 130, 1984.
- Döring, H.-P. & Starlinger, P. Molecular Genetics of Transposable elements in plants. *Ann. Rev. Genet.* 20: 175 - 200, 1986.
- Döring, H.-P., Freilind, M., Hake, S., Johns, M.A., Kunze, R., Merckelbach, A., Salamini, F., Starlinger, P. - A Ds-mutation of the *Adh1* gene in *Zea mays* L. *Mol. Gen. Genet.* 193: 199 - 204, 1984.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassome Corssi, P. - A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamid gels. *Anal. Biochem.* 112: 295 - 298, 1981.
- Evans, D.A. & Paddock, E.F. Comparison of somatic crossing over frequency in *Nicotiana tabacum* and three other crops species. *Can. J. Genet. Cytol.* 18: 57 - 65, 1976.
- Evans, D.A., Bravo, J.E., Kut, S.A., Flick, C.E. - Genetic behavior of somatic hybrids in the genes *Nicotiana: N. otophora* + *N. tabacum* and *N. sylvestris* + *N. tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 65: 93 - 101, 1983.
- Evans, D.A. - Somaclonal variation genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics.* 5: 46 - 50, 1989.
- Fedoroff, N.V. - Maize Transposable Elements. in *Mobile Genetic Element*, eds. Berg, D.E. e Howe,

- M.M. Academic Press. Inc. N. York.*
375 - 411, 1989a.
- Federoff, N.** - Maize transposable elements and development. *Cell*. **56**: 181 - 191, 1989b.
- Federoff, N.** - Maize transposable element regulation. *Maydica*. **40**: 7 - 12, 1995.
- Federoff, N.V., Wessler, S., Shure, M.** - Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*. *Cell*. **35**: 235 - 242, 1983.
- Federoff, N.D., Furtek, D., Nelson Jr., O.** - Cloning of the *Bronze* locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element *Ac*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**: 3825 - 3829, 1984.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B.** - A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high activity. *Anal. Biochem*. **132**: 6 - 13, 1983.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B.** - A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high activity. *Adendum. Anal. Biochem*. **137**: 266 - 267, 1984.
- Fincham, J.R.S., Sastry, G.R.K.** - Controlling elements in Maize. *Ann. Rev. Genet.* **8**: 15 - 50, 1974.
- Finnegan, D.J., Rubin, G.M., Young, M.W., Hogness, D.S.** - Repeated gene families in *Drosophila melanogaster*. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 1053 - 1063, 1978.
- Finnegan, E.J., Lawrence, G.L., Dennis, E.S. and Ellis, J.G.** - Behaviour of modified *Ac* elements in flax callus and regenerated plants. *Plant Molecular Biology*. **22**: 625 - 633, 1993.
- Fontdevila, A.** - Genetic instability and rapid speciation: Are they coupled? In *J.F. Mc Donald (ed). Transposable Elements and Evolution*. 242 - 253, 1993.
- Freeling, M. & Schwartz, D.** - Genetic relationships between the multiple alcohol dehydrogenase of maize. *Biochem. Genet.* **8**: 27 - 36, 1973.

- Freeling, M. & Birchler, J.A.** - Mutants and variants of alcohol dehydrogenase-1 gene in maize. In *"Genetic Engineering: Principles and Methods"*, ed. J. Setlow, A. Hollander. 5: 223 - 264. New York. Plenum, 1985.
- Freeling, M. & Bennett, D.C.** - Maize Adh1. *Ann. Rev. Genet.* 19: 297 - 323, 1985.
- Gegenbach, B.G., Green, C.E., Donovan, C.M.** - Inheritance of selected pathoxin resistance in maize plants regenerated from cells cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5113 - 5117, 1977.
- George, E.F. & Sherrington, P.D.** - *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics, Eversley, 1984.
- Gierl, A., Saedler, H. & Peterson, P.A.** - Maize transposable elements. *Annu. Rev. Genet.* 23: 71 - 85, 1989.
- Gierl, A.** - How maize transposable elements escape negative selection. *Trends in Genetics.* 6: 155 - 158, 1990.
- Gierl, A. & Saedler, H.** - Plant - transposable elements and gene tagging. *Plant Molecular Biology.* 19: 39 - 49, 1992.
- Gould, A.R.** - Factors controlling generation of variability *in vitro*. In: Vasil, I.K. (ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics in Plants.* 3. Plant Regeneration and Genetic Variability. 549 - 567. Academic Press. Orlando, 1986.
- Gracen, V.E. & Earle, E.D.** - Somaclonal variation in progeny of plants corn tissue cultures. *Twenty-First Annual Meeting of Illinois Corn Breeders School.* University of Illinois, USA. March 5 - 6, 1985.
- Green, G.E.** - Prospects for crop improvement in the field of cell culture. *Hortsci.* 12: 7 - 10.
- Gruenbaum, Y., Naveh - Many, T., Cedar, H., Razin, A.** - Sequence methylation in higher plant DNA. *Nature.* 292: 860 - 862, 1981.
- Hagemann, R.** - Somatische konversion bei *Lycopersicon esculentum* Mill. *Z. Vererbungsl.* 89: 587 - 613, 1958.

- Hagen, G. & Rubenstein, I.** - Complex organization of zein genes in maize. *Gene*. **13**: 239 - 249, 1981.
- Hartmann, C., Henry, Y., De Buyser, J., Aubry, C. & Rode, A.** - Identification of new mitochondrial genome organizations in wheat plants regenerated from somatic tissue cultures. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 169 - 175, 1989.
- Heinz, D.J. & Mee, G.W.P.** - Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species-hybrid clones derived from callus tissue. *Am. J. Bot.* **58**: 257 - 262, 1971.
- Holliday, R.** - The inheritance of epigenetic defects. *Science*. **238**: 163 - 170, 1987.
- Jackson, J.A. & Dale, P.J.** - Somaclonal variation in *Lolium multiflorum* L. & *L. temulentum* L. *Plant Cell Rep.* **8**: 161 - 164, 1989.
- James, M.G., Scanion, M.J., Qin, M., Robertson, D.S., Myers, A.M.** - DNA sequence and transcript analysis of transposon MU A2, a regulator of mutator transposable element activity in Maize. *Plant Molecular Biology*. **21**: 1181 - 1185, 1993.
- Johns, M.A., Mottinger, J. & Freeling, M.** - A low copy number, *copia*-like transposon in maize. *EMBO J.* **4**: 1093 - 1102, 1985.
- Johnson, L.B., Stuteville, D.L., Schlarbaum, S.E. & Skinner, D.Z.** - Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclones regenerated from non-mutagenized calli. *Crop Sci.* **24**: 948 - 951, 1984.
- Kaiser, K. & Murray, N.E.** - The use Phage Lambda replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries. In "DNA cloning". ed. D. M. Glover. **1**: 47, 1985.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L.** - New bacteriophage lambda vectors with positive for cloned inserts. *Methods Enzymol.* **101**: 3 - 21, 1983.
- Karp, A. & Bright, S.W.J.** - On the causes and origins of Somaclonal

- Variation. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell. Biol.* 2: 199 - 324, 1985.
- Klaas, M., Jhon, M.C., Crowell, P.N., Amasino, R.M.** - Rapid induction of genomic demethylation and T.DNA gene expression in plant cells by 5-azacytosine derivatives. *Plant Molecular Biology.* 12: 413 - 423, 1989.
- Kleckner, N.** - Translocatable elements in procaryotes. *Cell.* 11: 11 - 23, 1977.
- Kourilsky, P.** - Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells. *Trends in Genetics.* 3: 60 - 63, 1986.
- Kunz, B.A.** - Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalance. *Environ. Mutagen.* 4: 695 - 725, 1982.
- Kunze, R., Stochaj, U., Laump, J. & Starlinger, P.** - Transcription of transposable element Activator of *Zea mays L.* *EMBO J.* 6: 1555 - 1563, 1987.
- Kunze, R. & Starlinger, P.** - The putative transposase of transposable element *Ac* from *Zea mays L.* interacts with subterminal sequences of *Ac.* *EMBO J.* 8: 3177 - 3186, 1989.
- Lara, F.J.S. & Leite, A.** - Hibridação quantitativa em filtros. In "Hibridação de Ácidos Nucléicos". Sociedade Brasileira de Genética (ed). 35 - 45, 1995.
- Larkin, P.J.** - Somaclonal Variation: History, method and meaning. *Iowa State Journal of Research.* 4: 393 - 434, 1987.
- Larkin, P.J. & Scowcroft, W.R.** - Somaclonal variation - A novel source of variability from cell for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197 - 214, 1981.
- Larkin, P.J., Ryan, S.A., Brettell, R.I.S., Scowcroft, W.R.** - Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 67: 443 - 455, 1984.
- Lazar, M.D., Chen, T.H.H., Gusta, L.V. & Kartha, K.K.** - Somaclonal variation for freezing tolerance in population derived from norstar

- winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 75: 480 - 484, 1988.
- Lazzeri, P.A. & Shewry, P.R.** - Biotechnology of Cereals. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 11: 79 - 146, 1993.
- Lee, M. & Phillips, R.L.** - The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.* 39: 413 - 437, 1988.
- Lee, M., Geadelmann, J.L. & Phillips, R.L.** - Agronomic evaluation of inbred lines derived from tissue culture of maize. *Theor. Appl. Genet.* 75: 841 - 849, 1988.
- Levings, C.S. III, Kim, B.D., Pring, D.R., Conde, M.F., Mans, R.J., Laughnan, J.R., Gabay - Laughran, S.J.** - Cytoplasmic reversion of cms - S in maize: association with a transpositional event. *Science*. 209: 1021 - 1023, 1980.
- Lorz, H. & Scowcroft, W.R.** - Variability among plants and their progeny from protoplasts of heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 66: 67 - 75, 1983.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nutti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M.** - DNA methylation of embryogenic carrot cells cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. *Theor. Appl. Genet.* 77: 325 - 331, 1989.
- Ludwing, S.R., Habera, L.F., Dellaporta, S.L. & Wessler, S.R.** - *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 7092 - 7096, 1989.
- Ludwing, S.R., Bowen, B., Beach, L. & Wessler, S.R.** - A regulatory gene as a novel visible marker of maize transformation. *Science*. 247: 449 - 450, 1990.
- Malepszy, S. & Nadolska - Orczyk, A.** - In vitro culture of *Cucumis sativus*

- VIII. Variation in the progenie of phenotypically not altered R1 plants. *Plant Breeding*. 102: 66 - 72, 1989.
- Masson, P., Surosky, R., Kingsbury, J., Federoff, N.V.** - Genetic and molecular analysis of *Spm*-dependent *a-m2* alleles of the maize *a* locus. *Genetics*. 177: 117 - 137, 1987.
- Masson, P., Sirem, M., Federoff, N.** - The *tpnA* and *tpnD* gene products of the *Spm* element are required for transposition in tobacco. *Plant Cell*. 3: 73 - 85, 1991.
- McCarty, D.R., Carson, C.B., Stinard, P.S. & Robertson, D.S.** - Molecular analysis of *viviparous - 1*: Abscisic acid-insensitive mutant of maize. *Plant Cell*. 1: 523 - 532, 1989.
- McClintock, B.** - The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 36: 344 - 355, 1950.
- McClintock, B.** - Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*. 50: 174 - 181, 1951.
- McClintock, B.** - Mutations in maize and chromosomal aberrations in *Neurospora*. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*. 53: 254 - 260, 1954.
- McClintock, B.** - Further studies of the Suppressor - Mutator systems of control of gene action in maize. *Carnegie Instn Wash. Yb*. 60: 469 - 476, 1961.
- McClintock, B.** - Further studies of gene - control systems in maize. *Carnegie Instn Wash. Yb*. 62: 486 - 493, 1963
- McClintock, B.** - Aspects of gene regulation in maize. *Carnegie Instn Wash. Yb*. 62: 592 - 602, 1964.
- McClintock, B.** - The significance of responses of the genome to challenge. *Science*. 226: 792 - 801, 1984.
- Merckelbach, A., Döring, H.-P., Starlinger, P.** - The aberrant *Ds* element in the *Adh1-2F11::Ds* allele. *Maydica*. 31: 109 - 122, 1986.
- Mitra, J., Mapes, M.O. & Steward, F.C.** - Growth and organized development of cultured cells. The behavior of the nucleus. *Am. J. Bot*. 47: 357 - 368, 1960.

- Mottinger, J.P., Dellaporta, S.L., Keller, P.B.** - Stable and unstable mutations in aberrant ratio stocks of maize. *Genetics*. **106**: 751 - 755, 1984.
- Motto, M., Maddaloni, M., Ponziani, G., Brembilla, M., Marotta, R., Di Fonzo, N., Soave, C., Thompson, R., Salamini, F.** - Molecular cloning of the o2-m5 allele of *Zea mays* using transposon marking. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 488 - 494, 1988.
- Murashige, T.** - Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **25**: 135 - 166, 1974.
- Muller-Neumann, M., Yoder, J.I. & Starlinger, P.** - The DNA sequence of the transposable element *Ac* of *Zea mays* L. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 19 - 24, 1984.
- Nafziger, E.D., Wdholm, J.M., Steinrucken, H.C., Kilmer, J.L.** - Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to Glyphosate. *Plant Physiol.* **76**: 571 - 574, 1984.
- Nevers, P., Shepherd, N.A., Saedler, H.** - Plant transposable elements. *Adv. Bot. Res.* **12**: 102 - 203, 1986.
- Orgel, L.E. & Crick, F.H.C.** - Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*. **284**: 604 - 607, 1980.
- Orton, T.J.** - Genetic variation in somatic tissues: Methods or madness. *Adv. Plant. Pathol.* **3**: 153 - 189, 1983a.
- Orton, T.J.** - Experimental approaches to the study of Somaclonal Variation. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 67 - 76, 1983b.
- Orton, T.J.** - Genetic instability during embryogenic cloning of celery. *Plant Cell, Tissue Organ Culture.* **4**: 159 - 169, 1985.
- Osborne, B. & Baker, B.** - Movers and shakers: maize transposons as tools for analyzing other plant genomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 406 - 413, 1995.
- Ozias-Akins, P., Ferl, R.J., Vasil, L.K.** - Somatic hybridization in the Gramineae: *Pennisetum americanum* L.K. Schum. (Pearl millet) +

- Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass). *Mol. Gen. Genet.* 203: 365 - 370, 1986.
- Patterson, C.** - Introduction. In: *Patterson (ed): Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or Compromise? Cambridge University Press. Cambridge.* 1 - 22, 1987.
- Paul, A. L. & Ferl, R.J.** - In vivo footprinting reveals unique cis-elements and different modes of hypoxic induction in maize *Adh1* and *Adh2*. *Plant Cell.* 3: 159 - 168, 1991.
- Paz - Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., & Saedler, H.** - The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* protooncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J.* 6: 3553 - 3558, 1987.
- Peacock, W.J., Dennis, E.S., Gerlach, W.L., Llewellyn, D., Lörz, L., Pryor, A.L., Sachs, M.M., Schwartz, D., Sutton, W.D.** - Gene transfer in maize controlling elements and the alcohol dehydrogenase genes. In "Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plant and Animals". *Proc. Miami Winter Symp. Downey, K.V. (ed.).* 311 - 325. Academic Press Inc., 1983.
- Pereira, A., Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Bertram, L., Peterson, P.A., Saedler, H.** - Genetic and molecular analysis of the *Enhancer (En)* transposable element system of *Zea mays*. *EMBO J.* 4: 17 - 23, 1985.
- Pereira, A., Cypers, H., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z., Saedler, H.** - Molecular analysis of the *En/Spm* transposable element of *Zea mays*. *EMBO J.* 5: 835 - 841, 1986.
- Peschke, V.M., Phillips, R.L., Gegenbach, B.G.** - Discovery of transposable element activity among progeny of tissue cultured-derived maize plants. *Science.* 238: 804 - 807, 1987.
- Peschke, V.M., & Phillips, R.L.** - Genetic implications of Somaclonal

- Variation in plants. *Advances in Genetics*. **30**: 41 - 75, 1992.
- Peterson, P.A.** - A mutable pale green locus in maize. *Genetics*. **38**: 682 - 683, 1953.
- Peterson, P.A.** - Mobile elements in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **6**: 105 - 208, 1987.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S.M. & Peschke, V.M.** - Do we understand Somaclonal Variation. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proceedings of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. 24 - 29, 1990.
- Pijnacker, L.P., Sree Ramulu, K., Dijkhuis, P. & Ferwerda, M.A.** - Flow cytometric and karyological analysis of polysomaty and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 102 - 110, 1989.
- Pohlman, R.F., Federoff, N.V., Messing, J.** - The nucleotide sequence of the maize controlling element *Activator*. *Cell*. **37**: 635 - 643, 1984.
- Potrykus, I.** - Mutation und Ruckmutation extrachromosomal vererbter Plastidenmerkmale von *Petunia*. *Z. Pflanzenzucht*. **63**: 24 - 40, 1970.
- Potter, S., Truett, M., Phillips, M., Maher, A.** - Eucaryotic transposable genetic elements with inverted terminal repeats. *Cell*. **20**: 639 - 647, 1980.
- Prioli, A.J.** - Análise genética da tolerância à toxidez do alumínio em milho (*Zea mays L.*). Tese de Doutorado. UNICAMP, 1987.
- Rines, H.W. & Luke, H.H.** - Selection and regeneration of toxin-insensitive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoriae*. *Theor. Appl. Genet.* **71**: 16 - 21, 1985.
- Rivin, C.J., Zimmer, E.A., Walbot, V.** - In "Maize for Biological Research". 1982

- Robertson, D.S.** - Characterization of a mutator systems in maize. *Mutat. Res.* **51**: 21 - 28, 1978.
- Roeder, G.S. & Fink, G.R.** - DNA rearrangements associated with a transposable element in yeast. *Cell.* **21**: 239 - 249, 1980.
- Sachs, M.M., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Gerlach, W.L.** - Maize *Ac/Ds* controlling elements - a molecular viewpoint. *Maydica.* **28**: 289 - 303, 1983.
- Sachs, M.M., Dennis, E.S., Gerlach, W.L., Peacock, W.J.** - Two alleles of maize alcohol dehydrogenase 1 have 3' structural and poly(A) addition polymorphisms. *Genetics.* **113**: 449 - 467, 1986.
- Sacristán, M.D. & Melchers, G.** - The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **105**: 317 - 333, 1969.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** - In "Molecular cloning a laboratory manual". Ed. C. Nolan. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd edition. I: 2108 - 2111, 1989.
- Sand, S.** - Genetic control of gene expression: independent location of Flt (3) and its interactions with mutable locus in *Nicotiana*. *Genetics.* **83**: 719 - 736, 1976.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** - DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463 - 5467, 1977.
- Schmidt, R.J., Burr, F.A. & Burr, B.** - Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque.2*. *Science.* **238**: 960 - 963, 1987.
- Schiefelbein, J.W., Furtek, D.B., Raboy, V., Banks, J.A., Fedoroff, N.V., Nelson Jr, O.E.** - Exploiting transposable elements to study the expression of a maize gene. *Plant Genetics. Alan. R. Liss. Inc. N. York.* 445 - 459, 1985.
- Schiefelbein, J.W., Furtek, D.B., Dooner, H.K., Nelson, O.E.** - Two mutations in a maize *bronze - 1* allele

- caused by transposable elements of the *Ac-Ds* family alter the quantity and quality of the gene product. *Genetics*. 120: 767 - 777, 1988.
- Schlappi, M., Raina, R., Federoff, N.** - Epigenetic regulation of the maize *Spm* transposable element: novel activation of methylated promoter by TpnA. *Cell*. 7: 427 - 437, 1994.
- Schnable, P.S., Peterson, P.A.** Genetic evidence of relationship between two maize transposable element systems: *Cy* and *Mutator*. *Mol. Gen. Genet.* 215: 317 - 321, 1989.
- Schwartz, D.** Alcohol dehydrogenase in maize: Genetics basis for multiple isozymes. *Science*. 164: 585 - 586, 1969.
- Schwartz, D.** A method of high resolution immunoelectrophoresis for alcohol dehydrogenase isozymes. *J. Chromatogr.* 67: 385 - 388, 1972.
- Schwartz, D & Dennis, E.** Transposase activity of the *Ac* controlling element in maize is regulated by its degree of methylation. *Mol. Gen. Genet.* 205: 476-482, 1986.
- Schwartz, D. & Endo, T.** Alcohol dehydrogenase polymorphisms in maize-simple and compound loci. *Genetics*. 53: 709 - 715, 1966.
- Schwartz, D. & Osterman, J.** A pollen selection for alcohol dehydrogenase negative mutants in plants. *Genetics*. 83: 63 - 65, 1976.
- Schwarz-Sommer, A., Gierl, A., Cuypers, H., Peterson, P.A., Saedler, H.** Plant transposable elements generate the DNA sequence diversity needed in evolution. *EMBO J.* 4: 591 - 597, 1985.
- Schwarz-Sommer, Zs., Leclerq, L., Göbel, E., Saedler, H.** - *Cin4*, an insert altering the structure of the *A1* gene in *Zea mays*, exhibits properties of nonviral retrotransposons. *EMBO J.* 6: 3873 - 3880, 1987.
- Scowcroft, W.R.** - Somatic cell genetics and plant improvement. *Adv. Agron.* 29: 39 - 81, 1977.

- Skirvin, R.M.** - Natural and induce variation in tissue culture. *Euphytica*. 27: 241 - 266, 1978.
- Silva, M.J.** - Caracterização de mutantes ADH-0 em milho (*Zea mays L.*) obtidos através de Variação Somaclonal. *Tese de Mestrado*. UNICAMP. 1992.
- Smith, G.P.** - Evolution of Repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*. 191: 528 - 535, 1976.
- Snape, J.W.** - Doubled haploid breeding: Theoretical basis and practical applications. In "Review of *Advances in Plant Biotechnology*". A. Mujeeb-Kasi & L.A. Sitch, eds, pp. 19 - 29, 1989.
- Soave, C. & Salamini, F.** - Organization and regulation of zein genes in maize endosperm. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 304: 341 - 347, 1984.
- Spencer, T.M., O'Brien, J.V., Start, W.G., Adams, T.R., Gordon - Kamm, W.J., Lemaux, P.G.** - Segregation of transgenes in maize. *Plant Molecular Biology*. 18: 201 - 210, 1992.
- Stebbins, G.L.** - Darwin to DNA, Molecules to Humanity. *W. H. Freeman and Company, San Francisco*. 1982.
- Strobel, E., Dunsmuir, P., Rubin, G.M.** - Polymorphism in the chromosomal locations os elements of the 412, copia and 297 dispered repeated gene families in *Drosophila*. *Cell*. 17: 429 - 439, 1979.
- Stromer, J.N.; Hake, S.; Bennetzen, J.; Taylor, W.C.; Freeling, M.** - Regulatory mutants of maize *Adh1* gene caused by DNA insertions. *Nature*. 300: 542 - 544, 1982.
- Sundaresan, V. & Freeling, M.** - An extrachromosomal form of the *Mu* transposons of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4924 - 4928, 1987.
- Sutton, W.D., Gerlach, W.L., Schwartz, D., Peacock.** - Molecular analysis of Ds controlling element mutations at the *Adh1 locus* of maize. *Science* 223: 1265 - 1268, 1984.

- Talbert, L.E., Patterson, G.I., Chandler, V.L.** - *Mu* transposable elements are structurally diverse and distributed throughout the genus *Zea*. *J. Mol. Evol.* **29**: 28 - 39, 1989.
- Targon, M.L.N., Leite, A., Ottoboni, L.M.M., Malacrida, S.A., Silva, M.J., Turcinelli, S.R., Arruda, P.** - Somaclonal Variation, its possible origins and consequence. *In Biotechnology for Plant Production*. 47 - 58, 1991.
- Terada, R., Kyojuka, J., Nishibayashi, S., Shimamoto, K.** - Plant regeneration from somatic hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) and barnyard grass (*Echinochloa oryzicola* Vasing). *Mol. Gen. Genet.* **210**: 39 - 43, 1987.
- Van Slogteren, G.M.S., Hooykass, P.J.J., Schilperoort, R.A.** - Silent T.DNA genes in plants lines transformed by *Agrobacterium tumefaciens* are activated by grafting and by 5-azacitidine treatment. *Plant Molecular Biology*. **3**: 333 - 336, 1984.
- Van Sluys, Tempé, M.A., Federoff, N.** - Studies on the introduction and mobility of the maize *Activator* element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *EMBO J.* **6**: 3881 - 3889, 1987.
- Vasil, L.K.** - Molecular improvement of cereals. *Plant Molecular Biology* **25**: 925 - 937, 1994.
- Walbot, V. & Warren, C.** - DNA methylation in the alcohol dehydrogenase.1 gene of maize. *Plant Molecular Biology*. **15**: 121 - 125, 1990.
- Watson, J.C., Kaufman, L.S., Thompson, W.F.** - Developmental regulation of cytosine methylation in the nuclear ribosomal RNA genes of *Pisum sativum*. *J. Mol. Biol.* **193**: 15 - 26, 1987.
- Weil, C.F. & Wessler, S.R.** - The effects of plant transposable element insertion on transcription initiation and RNA processing. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 527 - 552, 1990.

**Weinberg, G., Ullman, B., Martin, D.,
W.** - Mutator phenotypes in
mamalian cell mutants with distinct
biochemical defects and abnormal
deoxyribo-nucleoside triphosphate
pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
78: 2447 - 2451, 1981.

Wessler, S. & Hake, S. - Maize Harvest.
The Plant Cell. 2: 495 - 499, 1990.

**Woodruff, R.C., Slatko, B.E. &
Thompson, J.N.** - Factors affecting
mutation rates in natural
populations. *The Genetics and
Biology of Drosophila. Academic
Press. London.* 37 - 124, 1983.

**Zemetra, R.S., Schotzko, D.J., Smith,
C.M. & Lauver, M.** - *In vitro*
selection for Russian wheat aphid
(*Diuraphis noxiz*) resistance in
wheat (*Triticum aestivum*). *Plant
Cell Reports.* 12: 267 - 279, 1993.

APÊNDICE I

Linhagens de Bactérias

DH5 α

Genótipo relevante: *F supE44*
 Δ (lacZYA -argF)U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15)
hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
(Hanahan, 1983).

Linhagem supressora de mutação âmbar (*supE44*), defectiva em recombinação (*recA1*), deficiente em restrição e proficiente em metilação no sistema Eco K (*hsdR17*).

A deleção dos genes do operon *lac* (*Δ lacU169*), e a presença do fragmento *lacZ Δ M15* inserido no prófago ϕ 80 permite sua utilização em testes de α -complementação na seleção de recombinantes.

A ausência de superprodução do repressor *lacI^r*, nesta linhagem, possibilita a realização do teste de α -complementação na ausência de IPTG (Hanahan, 1983).

Esta linhagem apresenta ainda as marcas cromossômicas para resistência ao ácido nalidíxico (*gyrA96*), e requerimento de suplementação de meio mínimo com tiamina, devido a mutação no gene *thi*.

A mutação no gene *end* (*endA1*) que codifica para Endonuclease I, aumenta o rendimento e a qualidade do DNA plasmidial preparado através de técnicas de minipreparação.

Esta linhagem foi empregada na preparação de células competentes, utilizadas nos experimentos de transformação durante as subclonagens.

SRB e SRB(P2)

Genótipo relevante: *sbcC recJ, uvrC*
umuC::Tn5(Kan^r) supE44 lac gyrA96
relA1 thi-1 endA1 mcrA Δ (mcrBC
hsdRMS mrr)171 [F' proAB lacI^r
lacZ Δ M15].

A linhagem SRB(P2) representa a linhagem SRB lisogênica para o bacteriófago P2.

Linhagens supressoras de mutação âmbar (*supE44*). A presença do gene *recJ*, mutante do gene *rec*, elimina a atividade de Exonuclease V, que juntamente com o gene mutante *sbcC*, agem diminuindo a perda de fagos recombinantes que apresentam sequências repetitivas.

A mutação de deleção dos genes do sistema *mcr* (*mcrA* e *mcrBC*), evitam a

restrição de DNAs contendo metilcitosinas nas sequências 5'-G^mCGC-3' e 5'-AG^mCT-3', favorecendo a construção de bibliotecas genômicas, a partir de DNAs de plantas, ricos em sequências contendo metilcitosinas.

Estas linhagens apresentam marcas genômicas de resistência a kanamicina (Tn5), e ácido nalidixico (*gyrA96*), requerimento de suplementação de meio mínimo com tiamina, devido a mutação no gene *thi* (*thi-1*).

Linhagens *lac*⁻, que apresentam a região *lacZΔM15* incluída no plasmídeo F', possibilitam sua utilização em testes de α -complementação. A presença do gene *lacI^f* torna indispensável a utilização de IPTG nos testes de α -complementação.

A hospedeira SRB(P2), lisogênica para o bacteriófago P2, responsável pelo fenótipo Spi, que impede o desenvolvimento, e portanto a formação de placas de lise, de fagos que apresentem as regiões *red* e *gam*.

Nos fagos recombinantes, os fragmentos de DNA clonados substituem estas regiões. Assim sendo a hospedeira SRB(P2) apresenta a capacidade de discriminar fagos recombinantes de não re-

combinantes, o mesmo não acontecendo com a hospedeira SRB.

Estas linhagens foram utilizadas na avaliação do número de fagos recombinantes, obtidos durante a construção do banco genômico de milho.

DL538

Genótipo relevante: *hsdR mcrA mcrB recD sbcC* (Whittaker *et al.*, 1988).

Linhagem Lac⁺ que apresenta características semelhantes às descritas para SRB, com exceção da marca de resistência à kanamicina.

Esta linhagem foi utilizada como hospedeira na construção do banco genômico de milho, durante a fase de seleção dos recombinantes. A preferência para a utilização desta linhagem em relação a linhagem SRB, deve-se ao fato da bactéria DL538 produzir placas de lise ligeiramente maiores do que as obtidas com a linhagem SRB.

APÊNDICE II

Vetores

λ DASH

O vetor λ DASH (Stratagene) é um vetor fágico de substituição, no qual o fragmento de 14 Kb, contendo os genes *red* e *gam* pode ser substituído por fragmentos entre 9 e 23 Kb. Os fagos recombinantes defectivos nas funções Red e Gam podem ser selecionados em linhagens

Rec⁺ lisogênicas para o fago P2 (fenótipo Spi).

O vetor apresenta um sítio de policlonação que possibilita a inserção de fragmentos provenientes de digestão com várias enzimas de restrição.

A região de clonagem é flanqueada pelos promotores dos fagos T3 e T7, o que permite a transcrição "in vitro" do fragmento clonado (Fig. 17).

Lambda DASH® Vector 41,900 bp

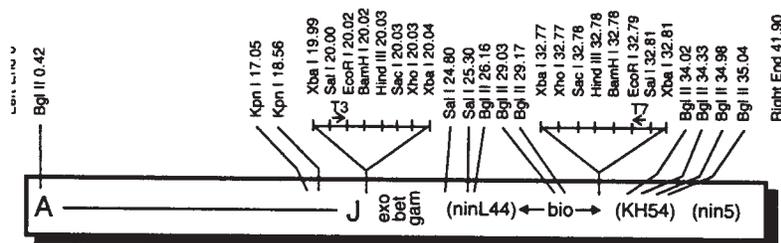


Figura 17: Mapa de restrição do bacteriófago λ DASH.

LOCAL E DATA: Campinas, 06 de fevereiro de 1996.

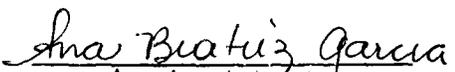
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

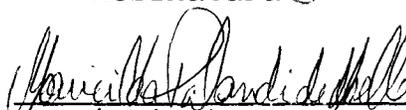
Prof. Dr. Adilson Leite (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Ana Beatriz Garcia


Assinatura

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello


Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

A P R O V A D A