

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/37540
IB/80791

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

B735_i



Rachel Carvalho Branquinho

**INSTABILIDADE DO GENE *WAXY* DA LINHAGEM Ast222 DE
MILHO (*Zea mays* L.): POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM UM
RETROTRANSPONSON**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese de doutorado (definitivo a)
Rachel Carvalho Branquinho
orientadora: Laudénir Maria Prioli

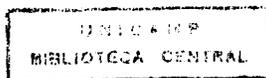
26/03/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia,
Departamento de Genética e Evolução
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas, área de Genética.

Orientadora: Prof^a Dra. Laudénir Maria Prioli

Campinas - SP

1999



UNIDADE	I 13
N.º CHAMADA:	T/C UNICAMP
	B 735i
V.	E.
TOMBO .BC/	B + B 4 C
PROC.	22919.9
C	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
PREÇO	R \$ 11,00
DATA	24/07/99
N.º CPD	40022311-9

RIB 000184207

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Branquinho, Rachel Carvalho

B735i Instabilidade do gene *waxy* da linhagem Ast222 de milho (*Zea mays L.*): possível associação com um retrotransposon/
Rachel Carvalho Branquinho. -- Campinas, SP:[s.n.],1999.
212f.:ilus.

Orientadora: Laudénir Maria Prioli

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Milho. 2. Genética-instabilidade. 3. Transposição-elementos.
I. Prioli, Laudénir Maria. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III.Titulo.

Rachel Carvalho Branquinho

**INSTABILIDADE DO GENE *WAXY* DA LINHAGEM Ast222 DE
MILHO (*Zea mays* L.): POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM UM
RETROTRANSPOSON**

Campinas

1999

Campinas, 26 de março de 1999

Banca Examinadora

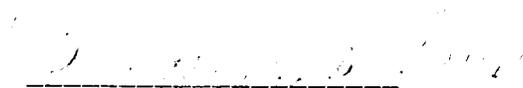
Professores Titulares

Profa. Dra. Laudénir Maria Prioli



Assinatura

Profa. Dra. Marie Anne Van Sluys



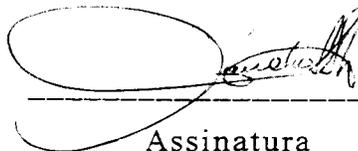
Assinatura

Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho



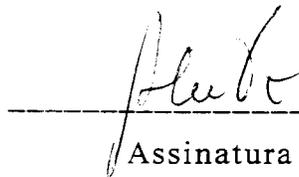
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Lopes de Souza Júnior



Assinatura

Prof. Dr. Adilson Leite



Assinatura

Professores Suplentes

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Profa. Dra. Cristine Hackel

Assinatura

Resumo / Abstract

Considerando-se a importância de se ampliar a base de conhecimentos sobre os mecanismos biológicos que causam mutações espontâneas, o interesse do presente trabalho foi a caracterização da instabilidade genética da linhagem endogâmica de milho (*Zea mays* L.) Ast222. Esta linhagem foi derivada de uma progênie instável obtida do retrocruzamento entre duas linhagens endogâmicas estáveis, a Ast-o2 e a L222, do Banco de Germoplasma do Depto. de Genética e Evolução - IB - UNICAMP. A instabilidade genética da linhagem Ast222 ocorre nos genes *waxy* (*wx*) e *amylose-extender* (*ae*), ambos atuando na via biossintética do amido do endosperma. Polimorfismos de restrição foram identificados entre os alelos *Wx* e *wx* da linhagem Ast222, e também entre os alelos *Wx* dos parentais L222 e Ast-o2. Análises de PCR confirmaram a existência de polimorfismo dentro da sequência codificadora do gene *waxy* entre as progênies mutantes e normais, pois obteve-se amplificação de sequências do alelo *Wx* e não do *wx*. Análises de northern blot demonstraram que o endosperma mutante da linhagem Ast222 não contém mRNA *waxy*. Todos estes resultados fortemente indicaram que a mutação *waxy* da linhagem Ast222 deveria ser consequência de uma extensa alteração na sequência nucleotídica deste gene, provavelmente uma deleção. A mutação *waxy* da linhagem Ast222 é estável, pois em aproximadamente 1.000 progênies (>150.000 sementes) de genótipo *wxwx* não se observou a reversão do fenótipo mutante para o normal. Esta característica foi confirmada em plantas F_1 e F_2 (Ast222wx-P147 x L222), pois as sementes normais possuíam setores *waxy* e as sementes *waxy* não possuíam setores normais. O cruzamento de plantas Ast222wx-P147 com plantas da linhagem L222 resultou em progênies com altas frequências de sementes normais com setores *waxy*. Como a linhagem L222 é estável, a indução da instabilidade somática destas progênies foi então associada à progênie Ast222wx-P147,

que é um germoplasma que vem apresentando atividade de instabilidade neste loco há muitas gerações. Assim, foi construído um banco genômico da progênie Ast222wx-P147. O clone $\lambda_{wx-Ast222}$ obtido deste banco genômico consistiu de aproximadamente 11.3kb e foi inteiramente sequenciado. O sequenciamento deste clone juntamente com os resultados de polimorfismos de restrição e de PCR do genótipo Ast222wx demonstraram que existe uma deleção do intron 6 até o exon 14 do gene *waxy* nestas progênies. Esta região do gene foi substituída por uma sequência de 1.9kb, que não possui similaridade com as sequências nucleotídicas descritas no GenBank. Imediatamente após esta sequência desconhecida foi encontrada uma sequência de aproximadamente 1.3kb com alta similaridade à LTR5', ao PBS e ao início da região *gag* do retrotransposon *PREM2* de milho. Esta mesma região também apresentou similaridade com o retrotransposon *Ji3* de milho. Em seguida à sequência de nucleotídeos com similaridade aos retrotransposons *PREM2* e *Ji3*, existe uma região do clone que possui similaridade, em nível de aminoácidos, com as poliproteínas dos retrotransposons *Tal* de *Arabidopsis* e *Tnt1* de tabaco. Através de PCR, foi demonstrado que a interrupção do gene *waxy* no intron 6 e a sua ligação com esta sequência flanqueadora 3' existe nas diversas progênies mutantes da linhagem Ast222 e do F₂(Ast222wx-P147 x L222), e está ausente nas linhagens normais. A existência de sequências com similaridades de nucleotídeos e de aminoácidos a retrotransposons na região flanqueadora 3' do alelo *wx* permite a sugestão do envolvimento deste tipo de elemento de transposição com a indução da mutação *waxy* na linhagem Ast222. Esta sugestão é fortemente sustentada também pelo fato de que as frequentes mutações nos genes *waxy* e *amylose-extender* deste germoplasma foram observadas sempre na direção do alelo normal para o mutante e são irreversíveis. Este modo de ação do sistema que induz mutações no germoplasma Ast222 está de acordo com o descrito para os diversos retrotransposons, exceto pelo

aspecto da frequente atividade na indução de mutações. Se for verdadeira a hipótese sobre o envolvimento de retrotransposons na indução da mutação *waxy* neste germoplasma, esta seria a primeira descrição de ativação de retrotransposon aparentemente não associada a estresse ambiental e sim a fatores genéticos do próprio genoma. Esta característica distinta da linhagem Ast222 indica que os mecanismos envolvidos na indução da mutação *waxy* podem ser ocasionados por um novo retrotransposon, ou por algum do tipo *PREM2* ou *Ji3* com características ainda não descritas. A sequência flanqueadora 3' do intron 6 do gene *waxy* poderia ser parte deste putativo retrotransposon ativo. Este retrotransposon pode estar envolvido diretamente com a instabilidade, causando mutação devido à deleção da sequência codificadora no momento da inserção. Por outro lado, este retroelemento poderia estar indiretamente associado com a instabilidade do loco *waxy* da linhagem Ast222. No envolvimento indireto, pode ser que foi gerada uma DSB para a inserção do retrotransposon. Esta quebra do cromossomo poderia iniciar eventos de recombinação entre as sequências homólogas dos alelos *Wx* e *wx*. Como o alelo *wx* possui uma deleção, a troca dos segmentos de DNA não ocorreria de maneira uniforme, levando à deleção do alelo *Wx*. Então, a ocorrência destes eventos em células com constante divisão mitótica para a formação do endosperma originaria os setores mutantes em tecido normal. Seja qual for o mecanismo responsável pela indução de mutações no loco *waxy* da linhagem Ast222, ele é incomum e provavelmente restrito à este germoplasma de milho.

Genetic instability in the *waxy* gene of the Ast222 inbred line of maize (*Zea mays* L.): a possible association with an active retrotransposon.

The objective of the present work was a molecular characterization of the genetic instability existent in the Ast222 inbred line of maize (*Zea mays* L.), aiming at a better understanding of molecular mechanisms that cause spontaneous mutations. The Ast222 inbred line was derived from an unstable progeny obtained from a backcross involving two stable inbred lines (Ast-o2 and L222). These lines belong to the Germplasm Bank of the Dept. of Genetics and Evolution, IB, State University of Campinas. The Ast222 genetic instability seems to be restricted to the *waxy* (*wx*) and *amylose-extender* (*ae*) loci, both active in the starch biosynthetic pathway of endosperm. Restriction polymorphisms were identified between Ast222 *Wx* e *wx* alleles, and the *Wx* allele of both parental lines Ast-o2 and L222. Polymorphism was confirmed by PCR analysis. Sequences of *Wx* normal allele were the only ones possible to be amplified by using several PCR primers. Immature endosperm of Ast222wx does not contain waxy mRNA. These results strongly indicated that the Ast222 waxy mutations should be a consequence of an extensive alteration in DNA sequence, probably a deletion of a large number of nucleotides. The Ast222 *wx* mutation is stable. As observed in approximately 1,000 progenies (>150,000 seeds), the Ast222 mutant phenotype did not revert to the wild type. This characteristic was confirmed in F₁ and F₂ (Ast222wx-P147 x L222) plants, with high frequencies of somatic instability in the endosperm. In these progenies, all mutational events were observed from normal to waxy phenotype. The Ast222wx-P147 progenies were highly unstable, generating high frequencies of waxy sectors in normal endosperm. Because the L222 inbred line is stable, this somatic instability seemed to be associated to the Ast222 inbred line, which is a genotype showing instability in many generations. Therefore, the Ast222wx-P147 progeny

was chosen to construct a genomic DNA bank. The clone $\lambda wx-Ast222$ consisting of about 11.3kb, was selected and sequenced. The results of DNA sequence, and restriction plus PCR polymorphisms demonstrated a deletion from intron 6 to exon 14 in the *wx* allele. This region was replaced by about 1.9kb without similarities in the Genbank. Immediately after this sequence, it was found a sequence of about 1.3kb with high similarity to the LTR5', PBS and beginning of the *gag* region of the maize retrotransposon *PREM2*. This same region was also similar to the *Ji3* maize retrotransposon. Downstream of this sequence highly similar to retrotransposons, it was found a region with aminoacid similarity to the polyproteins of both retrotransposons *Tal* in *Arabidopsis* and *Tnt1* in tobacco. By PCR amplifications and DNA sequencing, it was demonstrated that this same deletion at the intron 6 and the 3' flanking region are also present in all Ast222wx progenies tested, and absent in normal inbred lines. Sequences similar to retrotransposons at the 3' flanking region of the mutant waxy suggest an association of this kind of transposable element with the induction of waxy mutation in the inbred line Ast222. This suggestion is corroborated by the direction of these mutations always from normal to mutant, and because they do not revert to the wild type. These characteristics are in agreement with those described for different retrotransposons, except by the high frequency of activity. If the hypothesis on retrotransposon action inducing mutations in this maize germoplasm is true, this would be the first description of retrotransposon activation apparently without association with environmental stress. It seems that the activation of this retrotransposon could be due to genomic factors. The distinct Ast222 characteristic indicates that the mechanisms inducing waxy mutations could be due to a novel retrotransposon, or to a *PREM2* or *Ji3* type not yet described. The 3' flanking region could be part of this putative active retrotransposon. It could be directly involved with instability, inducing deletion during its insertion in the coding sequence.

On the other hand, this retroelement could be indirectly associated to the Ast222 waxy genetic instability. In this indirect action, a DSB could be generated allowing the retrotransposon insertion. The chromosome break could lead to recombination between *Wx* and *wx* homologous sequences. Because the *wx* allele has a deletion, this recombination could result in a non-uniform DNA exchange and a deletion in the *Wx* allele. These events occurring during mitotic division could generate mutant regions in normal endosperm tissues. Apparently, the molecular mechanism inducing mutations in the Ast222 waxy locus is unusual and probably restricted to this maize germplasm.

Dedico este trabalho aos meus pais e
ao meu querido irmão.

Agradecimentos

- Ao Julio pelo apoio, paciência e contínuo estímulo para que este trabalho fosse finalizado. O seu amor e carinho foram fundamentais!
- À minha querida cunhada pelo conforto e carinho nas horas mais difíceis do andamento deste trabalho. Aos meus sobrinhos que proporcionaram muitos momentos felizes nesta árdua fase da minha vida.
- À Mirian e ao Evandro pelo empréstimo do computador e pela valiosa contribuição em todo o trabalho e também pela amizade.
- À Rosângela pela constante e *paciente* colaboração para a realização deste trabalho. À Salete pela colaboração na lavagem da vidraria.
- À Silvia Turcinelli pela sempre atenção em me ensinar e a emprestar reagentes já prontos para o uso.
- À Adriana, Maria Elena, Silvia Geurgas, Ana Maria Espin e Ana Cláudia pela colaboração na realização do trabalho e pela saudável amizade. Ao Ed pela ajuda e alegria de todos os dias.
- À Claudinha, Teresa, Sandra Lima, Fabiana, Tânia, Maurício e todo o pessoal do CBMEG que contribuíram sempre de uma maneira direta para a realização deste trabalho. Agradecimento especial ao Márcio pela belas fotos que ele tirou das sementes.
- Ao William e a Maria Elisa pela amizade. A D^a. Cida e ao Sr. Bento pelo auxílio durante o trabalho, pelo carinho e amizade em todos estes anos de convivência.
- Aos membros da banca, pelas valiosas sugestões.
- À CAPES e à minha família pelo apoio financeiro

Índice

1- Introdução	1
2- Revisão Bibliográfica	4
2.1- Genes envolvidos na biossíntese do amido no endosperma de milho	4
2.2- Mecanismos geradores de variabilidade genética	6
2.3- Elementos genéticos móveis	16
2.4- Os retroelementos no genoma	20
3- Materiais e Métodos	57
3.1- Germoplasma	57
3.2- Experimentos de campo e análises fenotípicas de sementes	61
3.3- Análises do padrão de restrição de fragmentos de DNA genômico	62
3.4- Amplificação de sequências de DNA via PCR	65
3.5- Análise de RNA.....	68
3.6- Clones utilizados para a preparação de sondas de hibridização	69
3.7- Hibridização de membranas	76
3.8- construção do banco de DNA genômico	77
4- Resultados	87
4.1- Análises genéticas da instabilidade do loco waxy	87
4.2- Análise molecular do loco waxy	97
4.2.1- Avaliação de polimorfismo de restrição do loco waxy	97
4.2.2- Avaliação do loco waxy por PCR	119
4.2.3- Análise da expressão de RNA waxy	125
4.3- Avaliação do banco genômico	127
5- Discussão	156

6- Conclusões	187
7- Referências Bibliográficas	189

Lista de Abreviações

DAP	Dias após a polinização
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dATP	Deoxyadenosina 5'-triphosfato
dNTP	Deoxy (nucleotídeo)5'-triphosfato
EDTA	Etilenodiaminotetracetato dissódico
h	hora
HCl	Ácido clorídrico
LTR	Terminação longa e repetida
min	minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Cloreto de sódio e citrato trisódico
TAE	Tris-base e EDTA
TE	Tris e EDTA
Tris	Hidroximetil aminometano
UV	Ultra violeta

1- Introdução

Os mecanismos intracelulares envolvidos na geração de variabilidade genética são de grande importância para a adaptação dos organismos aos diferentes ambientes. A variabilidade genética não é importante apenas na evolução dos organismos, mas é também muito utilizada para o melhoramento de espécies animais e vegetais economicamente exploradas. Existem três principais fontes para a geração de variabilidade genética nos organismos, a mutação, a recombinação de sequências de DNA e a migração de indivíduos. A recombinação e a migração não são capazes de produzir variação sozinhas. Portanto, toda a fonte de variação deve ser a mutação.

Um dos principais mecanismos intracelulares geradores de mutação são os elementos móveis do genoma. Estes elementos foram descritos por McClintock em 1951 através da identificação de algumas mutações em milho (*Zea mays* L.) ocasionadas por genes que possuíam a capacidade de mudar de posição no cromossomo, que mais tarde passaram a ser denominados de elementos de transposição. Os elementos de transposição constituem um mecanismo intracelular capaz de produzir altas taxas de mutação. Esta capacidade de induzir mutações deve ter sido fundamental para a permanência destes elementos nos diferentes genomas no decorrer da evolução, uma vez que a frequência do surgimento de mutantes em populações naturais não é alta.

Até o momento, os elementos móveis do genoma foram encontrados em todos os organismos onde foram procurados. O milho é uma espécie muito interessante para o estudo de elementos de transposição devido ao grande número de marcadores genéticos conhecidos. Vários destes marcadores são mutantes envolvidos em vias biossintéticas, como exemplo a via de produção de proteínas e carboidratos do endosperma. Os mutantes destas vias podem ser facilmente detectados devido a alterações

morfológicas da semente em consequência de mudanças físico-químicas nos tecidos.

Os elementos móveis do genoma podem ser de dois tipos: os que se transpõem de DNA para DNA - os transposons; e aqueles que se transpõem via um intermediário de RNA - os retrotransposons. A ação dos transposons nos genomas é bem estudada e caracterizada por sua alta atividade de transposição e de indução de mutações. A inserção destes elementos em genes em geral ocasiona a perda total ou parcial da função gênica. A excisão do elemento de transposição pode restaurar a atividade do gene levando assim à reversão do fenótipo. As mutações geradas por transposons são na sua maioria instáveis. Pouco é conhecido sobre a atividade dos retrotransposons de plantas, pois eles estão praticamente inativos nos genomas, sendo aparentemente ativados somente em condições ambientais estressantes. Os retrotransposons têm sido descritos como incapazes de se excisar, portanto a ação deste tipo de elemento não deve ocasionar a reversão do fenótipo. Desta maneira, as mutações geradas por retrotransposons são estáveis. Sendo assim, tanto as mutações que surgem em populações naturais, como as que surgem em materiais de bancos de germoplasmas podem estar associadas à ação de elementos de transposição.

Há alguns anos, algo inusitado ocorreu com progênies do Banco de Germoplasma do Laboratório de Milho, do Departamento de Genética e Evolução, IB, da Universidade Estadual de Campinas. Em progênies retrocruzadas das linhagens endogâmicas Ast-02 e L222 observou-se o aparecimento de vários tipos de mutantes de endosperma. O surgimento destes mutantes foi atribuído à presença de um sistema indutor de mutações, já que estas mutações não existiam nos parentais. As progênies resultantes do retrocruzamento foram autofecundadas por quatro gerações consecutivas, com o objetivo de caracterizar o sistema que levou ao aparecimento concomitante destes mutantes de endosperma. Assim, foi

derivada uma linhagem endogâmica denominada Ast222. Durante quatro gerações de autofecundação (S7-S10) foram realizadas extensivas análises genéticas de segregação dos genes *waxy* e *amylose-extender*, incluindo-se teste de alelismo. Neste estudo, foram observados desvios de segregação altamente significativos para estes dois genes. As diferenças das proporções das classes segregantes foram interpretadas como consequência de instabilidade em células germinais. Nestas gerações, também foi observado o aparecimento de sementes com instabilidade somática para os locos *waxy* e *amylose-extender*. A comparação dos resultados obtidos neste estudo com os dados da literatura estimulou a formulação da hipótese de que os desvios de segregação e a instabilidade somática estariam provavelmente ocorrendo devido à ação de um elemento móvel no locos *waxy* e *amylose-extender* da linhagem Ast222 (Branquinho, 1993).

Considerando-se a importância de se conhecer melhor os mecanismos biológicos que causam mutações espontâneas e instabilidade genética em plantas, o presente trabalho teve o objetivo de:

- . Caracterizar o sistema indutor de mutações existente na linhagem Ast222.
- . Identificar a causa molecular da mutação *waxy* da linhagem Ast222.
- . Caracterizar em nível molecular as várias sublinhagens da linhagem Ast222.

2- Revisão Bibliográfica

2.1- Genes envolvidos na biossíntese do amido no endosperma de milho

Durante o desenvolvimento do endosperma, o armazenamento de carboidratos inicia-se basicamente com a ação da enzima sacarose sintase, que catalisa a conversão reversível da sacarose para UDP-glicose e frutose. O gene *shrunk*, que codifica esta enzima, está localizado no cromossomo 9. A mutação neste loco reduz de 2 a 6% a atividade da sacarose sintase e em 60% a quantidade de amido no endosperma (Choury & Nelson, 1976).

Os carboidratos metabolizados são basicamente acumulados na forma de amido. Este importante componente de reserva é encontrado na maioria dos tecidos em milho. No endosperma normal de milho encontram-se dois tipos de cadeias de amido. Uma linear denominada de amilose, que corresponde a 25-28% do amido e uma ramificada, a amilopectina, que perfaz cerca de 75% do total de amido do endosperma. Aparentemente existem vias únicas para a síntese de amido nos diferentes tecidos ou ainda pode existir uma regulação tecido-específica da expressão gênica (Dang & Boyer, 1989).

A biossíntese de amido ocorre na matriz do amiloplasto, e tem sido demonstrado que a ramificação e a desramificação do carboidrato ocorrem na matriz antes da associação dos polissacarídeos em grânulos de amido (Shannon & Creech, 1977). Vários genes envolvidos nesta via metabólica foram clonados. Entre eles estão os genes *waxy* (*wx*), e o *amylose-extender* (*ae*) (Shure *et al.*, 1983; Stinard *et al.*, 1993).

Estudos comparativos demonstraram que a enzima ramificadora de amido da folha é a BE IIa (Dang & Boyer, 1989). Sabe-se que o gene *amylose-extender* é estrutural e codifica a enzima BE IIb (Alexander & Creech, 1977). O mutante *ae* interfere na composição do amido do endosperma, porém não interfere na síntese deste carboidrato nas folhas. Este fato indica que BE IIa e BE IIb se expressam independentemente.

Estudos mais recentes confirmaram a expressão tecido-específica deste loco (Stinard *et al.*, 1993). Segundo Shannon & Creech (1977), o mutante *ae* altera a proporção de amido do endosperma apresentando 59,8% de amilose. Além disso, a reduzida fração de amilopectina apresenta menores pontos de ramificação do que a amilopectina encontrada no endosperma normal (Dang & Boyer, 1989). Estudos do efeito de dosagem do alelo *ae* demonstraram que a atividade enzimática de ramificação não se altera com o alelo nulo. Com o aumento da dose do alelo *Ae* observou-se um aumento linear na atividade ramificadora da enzima Iib (Dang & Boyer, 1989).

Outro mutante que altera a qualidade de amido no endosperma é o *waxy*, que está localizado no cromossomo 9 e foi descrito por Collins em 1909 (Alexander & Creech, 1977). O gene *waxy* codifica a enzima glicosiltransferase que é responsável pela síntese de amilose. O gene *waxy* apresenta expressão tecido-específica no grão de pólen e no endosperma. A regulação desta expressão é realizada em nível transcricional, pois não foi detectado mRNA *Wx* em tecido foliar (Klößgen *et al.*, 1986).

Mutações no gene *waxy* produzem um fenótipo viável e facilmente distinguível do selvagem. A identificação do mutante pode ser feita visualmente no caso do endosperma, ou em reação com iodo para a distinção do pólen. A mutação neste loco ocasiona a conversão de todo α -1,4-glucano em amilopectina no endosperma e no pólen. Portanto, o mutante *wx* não sintetiza a amilose, que reage com o iodo no endosperma normal. A falta de amilose resulta no fenótipo do endosperma sem brilho, ou seja ceroso (*waxy*), que dá o nome ao gene. A facilidade de distinção e a não letalidade do fenótipo mutante permitiu o isolamento de mais de 40 alelos mutantes *wx* desde a virada século (Varagona *et al.*, 1992).

Análises moleculares do loco *waxy* têm revelado que os alelos normais de muitas linhagens próximas apresentam polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) na região flanqueadora 5' do gene (Wessler & Varagona, 1985). Por outro lado, os alelos mutantes

caracterizam-se principalmente por deleções ou inserções de sequências nucleotídicas na região codificadora do gene (Varagona *et al.*, 1992).

2.2 - Mecanismos geradores de variabilidade genética

A variação genética é o combustível para os processos evolucionários. Existem três fontes de variação: mutação, recombinação em sequências de DNA e a migração de indivíduos. No entanto, a recombinação por si só não produz variação a menos que os alelos de um mesmo loci sejam diferentes. De maneira semelhante, a migração não fornece variação se toda a espécie for homocigota para o mesmo alelo. Portanto, a fonte de toda a variação deve ser a mutação.

Recombinação genética

Recombinação genética ocorre em todos os organismos e pode ser definida como a troca de sequências de DNA (Camerini-Otero & Hsieh, 1995). O evento inicial para ocorrer recombinação é a formação de quebra em uma única fita do DNA ou nas duas fitas (Meselson & Radding, 1975). A recombinação pode ocorrer entre dois cromossomos ou dentro de uma única fita do DNA em uma grande variedade de processos biológicos em células eucariotas. Entre estes processos estão a meiose, variação antigênica e a manutenção do número de cópias e homogeneidade de sequência em famílias gênicas (Osman & Subramani, 1998).

Os três principais tipos de recombinação são: homóloga, sítio-específica e recombinação ilegítima (não-homóloga). A recombinação homóloga tipicamente ocorre entre duas sequências de DNA com regiões de homologia. A troca de segmentos de DNA pode ocorrer ao longo de todo o cromossomo com qualquer tamanho de fragmentos homólogos (Osman & Subramani, 1998). Na recombinação homóloga a ligação da fita dupla de DNA possui uma certa precisão e fidelidade, mas não ocorre em sítios específicos. Como a troca de sequências de DNA pode ocorrer ao

longo dos dois cromossomos homólogos, as proteínas envolvidas no mecanismo de recombinação não são específicas para uma sequência e também não reconhecem sítios específicos de ligação no DNA (Camerini-Otero & Hsieh, 1995). Entre os mecanismos de recombinação homóloga, existe a recombinação ectópica. Neste evento ocorre a troca entre sequências de DNA que não estão em posições equivalentes nos cromossomos homólogos (não-alélicas). A quantidade mínima de homologia necessária para mediar a recombinação ectópica parece ser de 1.9 a 4.3kb (Baker *et al.*, 1996).

A recombinação sítio-específica ocorre precisamente entre locais definidos na sequência de DNA das duas moléculas. A recombinação sítio-específica, diferentemente da homóloga, não requer homologia total entre as sequências. Os sítios para este tipo de recombinação são constituídos de pequenas sequências de reconhecimento específico para uma ou mais proteínas que se ligam nas sequências para catalisar a recombinação (Osman & Subramani, 1998).

A recombinação ilegítima ou não-homóloga ocorre entre sequências de DNA sem nenhum sítio preferencial e com poucos pares de bases homólogas. Os eventos ilegítimos são não-conservativos, pois eles resultam em perda ou ganho de um pequeno número de nucleotídeos no sítio de recombinação de DNA (Osman & Subramani, 1998).

Os eventos de recombinação meiótica são observados em todos os eucariotos, mas os eventos somáticos são raros e frequentemente estão associados com um evento significativo do desenvolvimento. Alguns exemplos de eventos de recombinação somática reguladas pelo ciclo de vida do organismo são a formação de heterocisto em *Anabena*, a variação antigênica em *Borrelia* e cultura de tecidos de plantas (Das *et al.*, 1990). Por outro lado, a recombinação somática pode ocorrer independentemente de eventos significativos do desenvolvimento da planta, como demonstrado em milho (Das *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1995). O alelo *S* do gene que

codifica a zeína de 27kDa é constituído de dois segmentos de DNA, o gene *A* e o gene *B*. Cada um destes segmentos possui uma cópia funcional do gene. O alelo *S* possui a capacidade de se rearranjar ativamente para originar o alelo *Ra*, que possui apenas o segmento *A*. A ocorrência de rearranjo é ocasionada por recombinação entre os segmentos *A* e *B*, que leva à deleção do segmento *B*. A frequência em que estes rearranjos somáticos ocorreram foi considerada alta. Em indivíduos homozigotos (*S/S*) a frequência de rearranjo é menor do que nos indivíduos heterozigotos (*S/Ra*). Os rearranjos ocorreram na mitose, mas o produto do rearranjo pode ser transmitido aos descendentes. Em todos os eventos de rearranjo observados, a deleção ocorreu sempre com o gene *B* e sempre um mesmo sítio novo formava-se na extremidade 5'. Esta observação pode indicar a existência de um mecanismo programado que é sítio-específico. Extensivos estudos genéticos em milho têm demonstrado que as duplicações em genes são estáveis. Por isso, a instabilidade do alelo *S* é incomum e provavelmente específica para o estoque genético da linhagem A188 estudado. Nenhum exemplo de frequente rearranjo gênico somático foi descrito, exceto quando os transposons estão presentes (Das *et al.*, 1990). Posteriormente descobriu-se que o rearranjo do alelo *S* pode estar associado com a presença de um retrotransposon, o *Zeon1*. Este elemento está inserido no alelo *S* que se rearranja ativamente. Assim, foi sugerido por Hu *et al.* (1995) a associação deste retroelemento com o rearranjo do gene da zeína de 27kDa. Três possíveis mecanismos foram sugeridos para explicar o envolvimento da retrotransposição do *Zeon1* com o rearranjo somático do DNA. O primeiro mecanismo proposto é iniciado com a retrotransposição do *Zeon1* no alelo *S*. Este evento pode ocasionar a produção de transcritos com um pedaço da terminação 3' do gene *A*. Assim, um transcrito híbrido seria produzido e pode ser reversamente transcrito porque ele possui o sítio para um primer de tRNA que funciona como iniciador. Após o evento de quebra da fita dupla do DNA (DSB) do

alelo *S* ocorre conversão gênica utilizando como molde o cDNA. Este rearranjo de DNA resulta na deleção do segmento *B* do gene da zeína de 27kDa. Este mecanismo exige que transcritos muito longos fossem reversamente transcritos. No segundo modelo, a recombinação homóloga ocorre entre as repetições do gene ou entre cromátides irmãs. O evento de recombinação é estimulado pela DSB do DNA para a integração do cDNA na região 5' do gene *A* da zeína de 27kDa. O terceiro mecanismo proposto também necessita de quebras da fita dupla do DNA, mas a deleção do segmento *B* e a inserção do *Zeon1* podem ter originado do mesmo evento de conversão gênica. Nestes modelos existem alguns eventos que não são bem explicados pelos mecanismos propostos. De qualquer modo, em todos esses modelos foi sugerido que a quebra da fita dupla do DNA pela integrase é o primeiro evento a ocorrer no rearranjo do alelo *S*. Neste caso, a regulação deste evento depende da transcrição e expressão de um elemento autônomo (Hu *et al.*, 1995)

Os eventos de recombinação homóloga não somente geram variabilidade genética, como também tem sido mostrada a importante função deste mecanismo em reparar quebra da fita dupla do DNA. O reparo de DNA é essencial para a manutenção e propagação da informação genética. As quebras na fita dupla dos cromossomos podem ocorrer espontaneamente, e também podem ser induzidas por agentes como metil metasulfonato (MMS) e radiação ionizante. Em eucariotos, duas formas de reparo têm sido identificadas. Uma que repara DNA homólogo, a recombinação homóloga (HR), e a outra que repara DNA não-homólogo, ou seja, a junção de extremidades de DNA não-homólogo (NHEJ). O reparo de DSB pela HR resulta em um preciso reparo da lesão, mas requer a presença de sequências homólogas no genoma, seja um cromossomo homólogo ou uma cromátide irmã (Takata *et al.*, 1998). O reparo de lesão no DNA pela HR é possível porque a estrutura molecular gerada durante os eventos de

recombinação mitótica ou meiótica dos cromossomos são semelhantes aos que ocorrem no reparo de DSBs (Osman & Subramani, 1998).

Um outro mecanismo que aparentemente também está envolvido com o reparo de DSB de sequências não-homólogas está associado aos retrotransposons. O reparo feito pelo retrotransposon ocorre devido a existência de transcriptase reversa destes elementos. Esta enzima produz moléculas de cDNA que poderão ser integradas no local da quebra do cromossomo. A estrutura e a junção da sequência inserida sugere que o reparo ocorre primeiramente por recombinação não-homóloga. Os estudos que demonstraram o fenômeno de reparo de DSB por cDNA foram realizados com os elementos *LI* de humanos, *Ty1* de levedura e *CRE1* de *Crithidia* (Teng *et al.*, 1996). Os mecanismos envolvidos neste reparo devem ser muito simples e podem estar associado não somente com a transcriptase reversa dos retrotransposon, mas também com eles próprios. Este modelo envolve a síntese direta de um cDNA e a migração desta molécula para o local a ser reparado (Teng *et al.*, 1996). Descobertas corroborando este modelo foram descritas, onde observou-se a presença de fragmentos de DNA do retrotransposon *Ty1* em sítios de DSB do cromossomo. Em cinco exemplos desta inserção, quatro constituíram-se de sequências de cDNA da região R-U5 da LTR do *Ty1*. Esta região é a primeira parte do mRNA do *Ty1* a ser convertida no cDNA. A captura do cDNA ocorre por recombinação não-homóloga em sítios pré-existentes de DSB. Aparentemente, a captura de sequências deste elemento é consequência da retrotransposição do *Ty1*, embora a captura destes cDNAs possa ocorrer sem a indução de altos níveis de mRNA do retrotransposon. Existe a hipótese de que os cDNAs capturados sejam derivados de elementos *Ty1* mutantes que são incapazes de completar sua retrotransposição. Sugeriu-se que a captura destes cDNAs ocorre em sítios ao acaso ou em sítios de quebras programadas. Os eventos de captura de sequências de DNA das regiões R-U5 do *Ty1* no genoma aparentemente

ocorreram várias vezes na história evolucionária das leveduras. A captura de fragmentos de cDNA nos sítios de DSB pode ser uma explicação para a presença de pseudogenes e dos elementos LINES e SINES em muitos locais do genoma de mamíferos (Moore & Haber, 1996).

Uma outra linha de estudos que sugere que as DSBs são os iniciadores naturais de recombinação homóloga. Evidências experimentais foram obtidas em vários organismos, como *Escherichia coli* (Kobayashi, 1992), fago λ (Myers & Stahl, 1994) e fungos (Strathern *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 1989; Cao *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1995). Uma das enzimas que está sendo caracterizada como promotora de recombinação é a endonuclease HO. Esta enzima gera DSB em alelos de levedura, promovendo a conversão gênica quando o cromossomo quebrado é reparado por recombinação homóloga com um alelo não clivado (Nickoloff *et al.*, 1986; Ray *et al.*, 1988; Rudin & Haber, 1988). Foi testado se a endonuclease HO também seria capaz de promover a recombinação homóloga em *Arabidopsis* (Chiurazzi *et al.*, 1996). Neste estudo foi demonstrado que a expressão da enzima HO aumentou em 10 vezes a frequência de recombinação entre sequências invertidas e repetidas de dois genes β -glucuronidase (GUS) defectivos. A recombinação entre as duas repetições foi determinada por estudos histoquímicos da atividade de GUS. Os resultados obtidos permitiram sugerir que as DSBs dos cromossomos são 'hot spots' para a ocorrência de recombinação homóloga somática em *Arabidopsis* (Chiurazzi *et al.*, 1996). Também foi reportado que a DSB do cromossomo pode induzir a ocorrência de recombinação homóloga em calos de tabaco, ocorrendo entre um loco cromossômico cortado e uma cópia extracromossômica presente em T-DNA introduzido (Puchta *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que duas cópias cromossômicas em plantas podem recombinar-se eficientemente, se uma DSB for produzida em uma das cópias. No trabalho de Chiurazzi *et al.* (1996) foi demonstrado que a expressão da endonuclease HO em *Arabidopsis* aumenta significativamente

a frequência de recombinação homóloga somática entre repetições invertidas no cromossomo. Outros experimentos têm indicado que a ação das enzimas envolvidas na excisão dos transposons originam DSB que promovem a recombinação homóloga em milho (Athma & Peterson, 1991), *Caenorhabditis elegans* (Plasterk & Groenen, 1992) e *Drosophila* (Gloor *et al.*, 1991). A relação da presença de elementos de transposição com a indução de recombinação também foi descrita em *Saccharomyces cerevisiae*. Em *Saccharomyces*, a recombinação homóloga ocorreu entre elementos *Ty* que resultaram em deleção, inversão e translocação de sequências de DNA (Boeke & Corces, 1989). Neste exemplo, pode-se considerar que o retrotransposon foi a sequência homóloga substrato para a recombinação.

Em milho, foi descrito que o elemento *Ac* induz a ocorrência de eventos de recombinação no locus *P* (Athma & Peterson, 1991). O gene *P* de milho é responsável pela pigmentação vermelha do pericarpo, da espiga e de outros tecidos florais da planta. Este gene é flanqueado por dois segmentos de DNA que são repetições diretas. Os alelos deste gene são denominados *P* com os sufixos indicativos da expressão da coloração no pericarpo e na espiga. Assim, o alelo *P-rr* condiciona o pericarpo e a espiga vermelhos (red), o alelo *P-wr* determina o pericarpo branco (white) e a espiga vermelha, o alelo *P-ww* condiciona o pericarpo e a espiga brancos. O alelo *P-vv* determina o pericarpo e a espiga de fenótipo variegado (variegated). Este alelo *P-vv* é resultante da inserção de um elemento *Ac* no alelo *P-rr*. O alelo *P-vv* origina espontaneamente o alelo *P-ovov*, que condiciona a coloração laranja (orange) variegado (variegated) no pericarpo e na espiga. Observou-se uma deleção de 17kb no alelo *P-ovov*, que inclui 4.5kb do elemento *Ac* e 12.5kb do locus *P*. Esta deleção originou o alelo *P-ww*. Foi sugerido que o mecanismo envolvido na geração do mutante *P-ww* está relacionado com a DSB seguida de recombinação entre as sequências diretamente repetidas que flanqueiam o

gene *P*. Neste caso, a DSB pode ter sido feita pela transposase do elemento *Ac* que está neste loco. Não se sabe ao certo se o mecanismo de recombinação é dependente da atividade do elemento *Ac*, ou se o simples aumento na distância, causada pela inserção do elemento entre as repetições seria suficiente para a ocorrência do mecanismo de deleção. Neste trabalho foi sugerido que o elemento *Ac* induz a recombinação homóloga no locus *P*, devido a desestabilização das sequências diretamente repetidas que estão flanqueando o gene (Athma & Peterson, 1991).

O primeiro exemplo descrito sobre a utilização de recombinação homóloga ectópica como um mecanismo adicional de reparo de DSB em planta envolveu o elemento de transposição *Ac* de milho (Shalev & Levy, 1997). Para este estudo foi construído um sistema no qual a atividade do GUS seria restaurada pela recombinação entre duas sequências homólogas ectópicas em plantas transgênicas de tabaco, demonstrando assim, a ocorrência dos eventos de recombinação. O modelo proposto para os eventos de recombinação ectópica envolve vários passos. Primeiramente, ocorre a excisão do elemento que gera DSB, em seguida ocorre a degradação de nucleotídeos para exposição da região 3' da fita simples do DNA e então ocorre a invasão de sequências homólogas ao sítio hospedeiro para que estas sequências sejam usadas como molde no reparo (Engels *et al.*, 1990; Nassif *et al.*, 1994). O molde para o reparo do sítio hospedeiro pode ser da cromátide irmã, de sequências alélicas no cromossomo homólogo ou ainda de sequências não-alélicas (ectópicas) (Engels *et al.*, 1990). A excisão do *Ac* induziu baixos níveis (10^{-4} - 10^{-5}) de recombinação homóloga de sequências genômicas não-alélicas. As moléculas de DNA recombinantes foram detectadas apenas em plantas com *Ac*, mas não em plantas com o elemento não-autônomo *Ds*. Estes dados mostraram que a recombinação homóloga é usada para o reparo da fita de DNA após a excisão do *Ac* em plantas transgênicas de tabaco (Shalev & Levy, 1997).

Outro elemento de transposição que também está envolvido com rearranjos gênicos é o *Mu* em milho. A presença deste elemento no gene *Kn1-O* pode ocasionar vários tipos de rearranjos cromossômicos. Este gene é um dos responsáveis pela morfologia da folha de milho, condicionando o fenótipo 'knotted'. O *Kn1-O* é composto por uma duplicação em tandem de 17kb. As duplicações são compostas de toda a região codificadora mais 400pb de sequência flanqueadora 5' e 10kb da sequência flanqueadora 3'. Em alguns casos, a inserção do *Mu* aumenta a frequência de recombinação no alelo *Kn1-O*, criando alelos derivados nos quais o elemento e uma cópia da repetição foram perdidos. Estes alelos derivados condicionam o fenótipo normal. Em dois outros alelos derivados, não ocorreu a perda da duplicação e no lugar do elemento foi inserido um fragmento de 1.7kb e outro de 3kb. Estas inserções consistem de sequências que normalmente são encontradas em região flanqueadora de uma das unidades de repetição. Assim, os alelos derivados ficaram com a duplicação em tandem separadas por inserções de sequências flanqueadoras. O alelo que possui a inserção de 1.7kb minimiza a expressão do fenótipo 'knotted'. Já inserção do fragmento de 3kb suprime completamente o fenótipo 'knotted'. A produção destes alelos derivados foi explicada como sendo resultante de conversão gênica que por sua vez foi estimulada pela DSB gerado pela excisão do *Mu* (Mathern & Hake, 1997).

Outro elemento de transposição que também está envolvido com quebras cromossômicas é o *Ds*. Alguns destes elementos geram quebras cromossômicas que dão início ao ciclo de quebra-fusão-ponte de cromossomos. A quebra do cromossomo pode permitir a fusão de cromátides que originam então um cromossomo dicêntrico e um fragmento acêntrico (McClintock, 1946, 1948). Durante as subseqüentes divisões mitóticas, as quebras e fusões formam outros cromossomos dicêntricos e fragmentos acêntricos, continuando assim o ciclo de quebra-fusão-ponte (McClintock, 1938). Sabe-se que os elementos que predominantemente se

transpõem diferem daqueles que predominantemente causam quebras cromossômicas. Um dos elementos *Ds* que especialmente causa quebra em cromossomos é o 'double *Ds*'. Este elemento é composto de dois elementos *Ds*, um inserido dentro do outro, em orientações opostas. Este 'double *Ds*' foi encontrado em uma inserção no gene *shrunk*, causando quebra no cromossomo 9 (Weck *et al.*, 1984). A presença de dois elementos *Ds* em orientações opostas dentro do gene *waxy* também causa quebra no cromossomo 9 (Weil & Wessler, 1993).

Contrariando as descrições de que os elementos de transposição podem estimular os eventos de recombinação, foi demonstrado que nos locus *Bz* e *Wx* de milho este fenômeno não ocorre. A inserção do *Ac* em heteroalelos *wx* não estimula a recombinação meiótica intragênica (Nelson, 1976). Fato semelhante também foi observado em heteroalelos *bz* resultantes da inserção do *Mu* (Dooner & Ralston, 1990). Visando avaliar a existência ou não de interação entre recombinação homóloga e transposon no locus *bz*, foi realizada uma ampla avaliação genética deste gene. Neste estudo observou-se que a frequência de recombinação meiótica entre sequências homólogas não foi aumentada pela presença do *Ac* em heteroalelos do *bz*. A presença de sequências homólogas tanto em *trans* (cromossomo homólogo) como em *cis* (duplicação em tandem) não promoveu a recombinação. A falta de interação entre a excisão do *Ac* com a recombinação poderia ser devida à separação temporal ou espacial destes eventos. Existem evidências de que estes eventos ocorrem em tempos distintos. A transposição do *Ac* ocorre durante a replicação do DNA na fase S, antes do pareamento dos cromossomos homólogos. A recombinação ocorre no zigóteno, ou logo depois, ainda durante a primeira divisão meiótica, quando os cromossomos estão pareados. Se a transposase tiver uma 'vida curta', pode ser que ela não esteja presente nos estágios mais tardios da divisão celular, quando ocorre a recombinação meiótica (Dooner & Martínez-Férez, 1997a). Neste estudo, foi observado que a inserção do

Ac pode desestabilizar a duplicação do locus *bz* (Dooner & Martinez-Ferez, 1997b). Além disso, foi sugerido que os elementos de transposição que são capazes de se excisar podem estimular eventos de recombinação, porque eles criam DSB nos cromossomos no momento da excisão. Por outro lado, os elementos que não possuem a capacidade de se excisar, claramente inibem a recombinação meiótica em milho (Dooner, 1986; Dooner & Martinez-Férez, 1997a).

Os vários estudos têm demonstrado que os eventos de recombinação ou rearranjo gênico espontâneos geralmente, ocorrem em genes que possuem repetição do próprio segmento gênico ou de sequências adjacentes. As evidências experimentais sugerem a importância das DSBs como iniciador dos eventos de recombinação. Um dos principais agentes de DSB nos genomas são os transposons, por isso deve existir uma íntima relação entre os eventos de transposição com os de recombinação. Até o momento, a maioria dos eventos de recombinação mitótica descritas em genes de milho envolveram a presença de sequências repetidas e de transposon.

2.3 - Elementos genéticos móveis

Os elementos genéticos móveis foram originalmente descritos em uma planta superior - o milho - pela citogeneticista Barbara McClintock, quem nas décadas de 40 e 50, pela primeira vez definiu o conceito de transposição. Desde então, elementos de transposição têm sido identificados em todos os organismos até hoje pesquisados, desde as bactérias até os eucariotos superiores (Finnegan, 1989; Grandbastien, 1992).

Os elementos móveis do genoma são divididos em duas classes principais, de acordo com o seu mecanismo de propagação. Os elementos da classe I, os retroelementos, que se transpõem via um intermediário de

RNA (Boeke and Corces, 1989). E os elementos da classe II, os transposons, que se movem de DNA para DNA (Finnegan, 1989). Os retroelementos são elementos de transposição que possuem estruturas semelhantes aos retrovírus, portanto comportam-se muito mais como tais (Fosket, 1994). A diferença entre eles é que os retrovírus codificam proteínas que permitem sua montagem em virion infeccioso, que é liberado da célula hospedeira, enquanto que os retroelementos não possuem esta capacidade. O mecanismo de retrotransposição é iniciado pela transcrição do elemento, formando assim um mRNA que será utilizado como molde pela transcriptase reversa para a síntese da cópia de DNA, que será novamente integrada ao genoma hospedeiro. Os genes necessários para a retrotransposição são *gag* e *pol*, sendo que o *pol* codifica a transcriptase reversa e integrase, enquanto que o *gag* codifica protease (Fosket, 1994).

Dentro dos elementos da classe dos retroelementos existem dois grupos: os que são flanqueados por extremidades longas e repetidas (LTR) e os que não são flanqueados pelas LTRs. Os retroelementos que são flanqueados pela LTR são denominados de retrotransposons, enquanto que os do segundo grupo são denominados de retrotransposon sem LTR ou retroposons. Os retrotransposons possuem uma LTR na extremidade 5' do elemento (LTR 5') e uma outra LTR na extremidade 3' (LTR 3') e também ORFs semelhantes aos genes *gag* e *pol* dos retrovírus. As LTRs têm sido descritas como sequências contendo de 115pb a 4.2kb nos diversos retrotransposons. Os retroposons possuem ORFs potenciais para codificar transcriptase reversa e RNase H e são terminados por uma região rica em nucleotídeo adenina (Grandbastien, 1992).

Os retrotransposons usam um sítio de ligação de um primer (PBS), para o início da transcrição reversa da primeira fita de DNA. Em plantas, em geral, o PBS é complementar à extremidade 3' do iniciador de tRNA de metionina. Este sítio localiza-se em uma região logo abaixo da LTR 5'. Para a síntese da outra fita de DNA, o início da transcrição ocorre em uma

região de polipurina (PPT), que em geral está localizada acima da LTR 3'. As LTRs podem ser divididas em três regiões funcionais - U3, R e U5. As LTRs dos retrovírus são de tamanhos variados, e a maior variação é encontrada dentro da região U3. As regiões R e U5 são as mais conservadas nas diferentes espécies de vírus (Temin, 1981). A região U3 contém o promotor para a RNA polimerase II, com sequências regulatórias do tipo TATA e CCAAT boxes. A região R é definida como um sítio de poliadenilação e a U5 é a região abaixo deste sítio (Temin, 1981; Birnstiel *et al.*, 1985; Varmus, 1983). As LTRs possuem pequenas extremidades invertidas e repetidas, em geral de 5-8pb, que quase sempre são iniciadas e terminadas pelos dinucleotídeos canônicos 5'TG...CA3'. Normalmente existe uma repetição direta na região flanqueadora das LTRs resultante da quebra e integração do retroelemento no cromossomo. Os nucleotídeos das repetições são sintetizados para reparo das fitas de DNA após a integração do retroelemento, utilizando o DNA hospedeiro como molde (Purugganan & Wessler, 1994). O número de nucleotídeos desta repetição direta parece ser variável, geralmente constituindo-se de 4 a 8 pb.

Dependendo da ordem dos seus domínios codificadores, os retrotransposons podem ser classificados em dois tipos: *copia* e *gypsy*. No tipo *copia* a integrase está posicionada na região 5' da transcriptase reversa, enquanto que no tipo *gypsy* ela está posicionada na região 3'. A transcriptase reversa dos elementos do tipo *copia* é bastante conservada em nível de aminoácidos, porém em nível de sequência de nucleotídeos existe uma divergência entre os diferentes elementos (Voytas *et al.*, 1992).

Alguns exemplos de retroposons são os elementos nucleares longos e dispersos (*LINES*) de mamíferos, os pequenos elementos nucleares dispersos (*SINES*) de mamíferos e os *elementos I* de *Drosophila*. Em plantas apenas poucos retroposons foram descritos, tais como o *cin4* de milho (Schwarz-Sommer *et al.*, 1987), *del2* de lírio (Leeton & Smyth, 1993), e mais recentemente o *SI* de *Brassica* (Gilbert *et al.*, 1997). Por

outro lado, os representantes dos retrotransposons de plantas são vários, tais como o *Bs1* (Jin & Bennetzen, 1989), *Hopscotch* (White *et al.*, 1994) e *PREM-2* (Turcich *et al.*, 1996) em milho, o *Tnt1* de tabaco (Grandbastien *et al.*, 1994), *Tos* de arroz (Hirochika *et al.*, 1992), e *Athila* de *Arabidopsis* (Pélissier *et al.*, 1995). O retrotransposon *Bs1* foi caracterizado porque uma cópia do elemento inseriu-se no locus da *Adhl*, resultando em um alelo nulo da álcool desidrogenase (Jin & Bennetzen, 1989). O retroelemento *Hopscotch* também foi caracterizado porque gerou mutação, a sua inserção no exon 12 do gene *waxy* resultou na mutação *wx-K* (White *et al.*, 1994). Já o retrotransposon *PREM-2* não foi encontrado dentro de sequências codificadoras de genes, mas em regiões flaqueadoras 5' (Turcich *et al.*, 1996).

Os elementos da classe II, os transposons, contêm uma região codificadora da transposase, enzima responsável pela transposição, e de extremidades invertidas e repetidas (TIR) (Fedoroff, 1989). Os transposons têm sido classificados em famílias. A identificação dos transposons dentro de uma mesma família depende da resposta à ativação por outro elemento, através do reconhecimento da TIR. As famílias são compostas de elementos autônomo e não-autônomos. O elemento não-autônomo é ativado apenas por um elemento autônomo correspondente. Geralmente, o elemento não-autônomo é derivado de uma deleção de nucleotídeos do autônomo (Peterson, 1980). Um elemento autônomo é capaz de promover a sua própria excisão e transposição, independentemente de outros elementos. Um elemento não-autônomo não é capaz de transpor por si só, necessitando para tal da presença do elemento autônomo. Os elementos autônomos são capazes de ativar um não-autônomo tanto em *cis* como em *trans*, suprindo-lhes as funções necessárias para ativação da transposição. Em milho, há várias famílias de transposons descritas, sendo as mais conhecidas: *Ac* (Activator, autônomo)/ *Ds* (Dissociation, não-autônomo);

Spm (Supressor-mutator, autônomo)/ *dSpm* (defectivo, não-autônomo); *Dt* (Dotted); *Mu* (Mutator); *Bg* (Bergamo, autônomo)/ *rBg* (não-autônomo).

Os elementos móveis do genoma se distinguem não apenas pelo seu mecanismo de propagação, mas principalmente pelo comportamento diferenciado e pelo número de cópias em que eles estão presentes nos genomas. Os transposons de plantas são conhecidos pela sua capacidade de gerar mutantes. Já os retrotransposons de plantas são mais conhecidos pelo alto número de cópias que eles são encontrados nos genomas. Outra característica que distingue bastante os elementos móveis do genoma são seus processos de ativação. Os transposons podem ser ativados em qualquer fase do desenvolvimento do hospedeiro, a frequência de transposição e o tempo de reversão são regulados pelo próprio elemento (McClintock, 1964). Por outro lado, os retrotransposons somente são ativados sob condições ambientais estressantes (Wessler, 1996). Os transposons possuem uma tendência de se inserir em regiões codificadoras e os retrotransposons em regiões intergênicas (SanMiguel *et al.*, 1996). O movimento de excisão do transposon permite que ocorra a reversão do fenótipo mutante para o normal (Wessler, 1988). Como a retrotransposição é replicativa, as mutações geradas por estes elementos têm sido observadas como não reversíveis.

2.4 - Os retroelementos no genoma

A evolução dos elementos de transposição nos genomas

Embora numerosos elementos de transposição tenham sido isolados e caracterizados, pouco se sabe sobre a evolução molecular destas sequências móveis do genoma. O modo e o tempo necessários para a evolução, bem como as forças que moldam as sequências destes elementos é muito pouco conhecida. Porém, como os elementos de transposição dependem de vários fatores do genoma hospedeiro, como a maquinaria

para transcrição e tradução, deve existir uma íntima co-evolução entre o hospedeiro e o elemento. Para desvendar a origem dos elementos móveis dos genomas, uma série de questões poderiam ser levantadas. Os elementos de transposição seriam derivados de uma sequência progenitora que habitava o ancestral comum à todos eucariotos atuais? Ou eles surgiram em um determinado tempo seguindo a evolução dos principais grupos de eucariotos como metazoários, fungos e plantas (Flavell, 1992)?

Uma das hipóteses sugeridas para a origem dos elementos de transposição de eucariotos é a de que eles teriam vindo dos elementos de transposição *IS* de bactéria (Cavalier-Smith, 1991 em Capy *et al.*, 1997). Estes elementos representam inserções de sequências de DNA (*IS*) em organismo procarioto. Esta hipótese foi formulada com base nos dados de comparação de sequências de domínios da transposase e integrase entre diferentes organismos. Os estudos indicaram que os transposons e os retrotransposons são representantes de dois grupos monofiléticos, com os elementos *IS* de bactéria aparecendo em várias partes da árvore. A posição que alguns elementos *IS* ocupam na árvore filogenética parecem indicar que os domínios da transposase e integrase se originaram das bactérias. Portanto, de acordo com estes autores, os transposons provavelmente se originaram das bactérias. Por outro lado, tem sido mais difícil tentar explicar a origem da transcriptase reversa dos retrotransposons. A hipótese sugerida é a de que a transcriptase reversa teria se originado dos introns do grupo II, depois da migração do DNA de organelas para o núcleo em eucariotos ancestrais (Cavalier-Smith, 1991 em Capy *et al.*, 1997). Desta forma, as enzimas integrase, transposase e transcriptase reversa, essenciais para a existência dos elementos de transposição, podem realmente ter se originado de um ancestral comum, considerando a origem simbiótica de organelas. No decorrer da evolução estes domínios foram agrupados nos eucariotos para iniciarem a formação dos retrotransposons, e

posteriormente dos retrovírus com a aquisição do gene *env* (Capy *et al.*, 1997).

Considerando-se a hipótese de que os elementos de transposição existiam em um ancestral comum a todos os eucariotos, então, as espécies mais proximamente relacionadas devem conter elementos mais relacionados. Por outro lado, as espécies mais distantes devem possuir sequências de elementos mais distantes, supondo que a taxa de acúmulo de mutação em diferentes espécies seja constante. Desta forma os elementos móveis do genoma seriam transmitidos verticalmente no decorrer da diferenciação das espécies. A segunda hipótese sugere que os elementos de transposição surgiram independentemente nos vários grupos e, conseqüentemente, elementos semelhantes poderiam estar presentes em espécies distantes (Capy *et al.*, 1997).

Evidências experimentais que se enquadram nas duas hipóteses têm sido encontradas. A justificativa para elementos semelhantes estarem presentes em espécies distantes tem sido baseada na possível ocorrência de transmissão horizontal. Tem sido sugerido que os mecanismos de transmissão horizontal poderiam ser vetores como vírus, ácaros ou qualquer outro parasita externo (Flavell, 1992); ou ainda o cruzamento entre espécies superando o isolamento reprodutivo (Purugganan & Wessler, 1994). Portanto, a evolução dos elementos de transposição podem ocorrer tanto por processos mutacionais durante a transmissão vertical como por transmissão horizontal entre as diferentes espécies. Assim, tem sido sugerido que as duas hipóteses de dispersão dos elementos móveis do genoma ocorreram ou ainda ocorre nos organismos.

Exemplos da permanência de alguns elementos em espécies distantemente relacionadas são observados nos diferentes reinos. Como no caso da família de elementos *Alu* de humanos que está presente em espécies que se divergiram há mais de 65 milhões de anos atrás. Os elementos da família *Tourist* de milho estão também presentes em arroz,

indicando uma conservação de mais de 50 milhões de anos. A permanência dos elementos *Alu* e *Tourist* nos genomas durante todo este período refletem o sucesso destas famílias nos seus hospedeiros (Bureau & Wessler, 1994a).

Outros exemplos de conservação de retroelementos têm sido observados no gênero *Zea*, como é o caso do *Bs1* que está presente tanto no milho como no teosinte. Tem sido sugerido que este retroelemento deve pertencer ao genoma do gênero *Zea* desde antes da diferenciação do teosinte em milho (Fuerstenberg & Johns, 1990). Os retrotransposons da família *magellan*, também pertencentes ao gênero *Zea*, apresentam uma íntima relação filogenética com os hospedeiros (Purugganan & Wessler, 1994). A comparação do elemento *magellan* com a filogenia de espécies do gênero *Zea* sugere que o padrão de distribuição do elemento dentro deste gênero resulta tanto da transmissão vertical direta, como de mecanismos de transferência entre espécies. Em sua maioria, as subfamílias *magellan* parecem ter sido herdadas verticalmente, pois existe uma correspondência entre a filogenia das subfamílias e suas espécies hospedeiras. Os elementos *magellan*, que teriam sido transferidos de modo horizontal, foram muito provavelmente transferidos para outras espécies por cruzamentos interespecíficos, que no gênero *Zea* geram híbridos férteis e viáveis (Doebley, 1983). Reforçando esta hipótese, está a teoria de que as espécies de *Zea* evoluíram em contato biogeográfico no México e na América Central (Doebley, 1990). Pode ser que os elementos de transposição sejam mais capazes de se mover entre os genomas das espécies de plantas do que entre genomas animais, pois as plantas são mais passíveis de cruzamento entre espécies (Purugganan & Wessler, 1994).

Considerando-se ainda os retroelementos, uma relação filogenética foi estabelecida através da comparação de sequências da transcriptase reversa. Um dos resultados sugeriu que os retrovírus teriam sido derivados do grupo *gypsy* de retrotransposons, vindo mais tarde a adquirir o gene

env, ganhando assim a capacidade de infectar novas células. Porém, um dos problemas atuais desta hipótese é que os retrovírus são restritos aos vertebrados onde ainda não foram encontrados retrotransposons do tipo *gypsy*. No entanto, têm-se encontrado evidências de que o grupo *gypsy* contém uma ORF que é típica do gene *env* de retrovírus. Os retrotransposons teriam, então, perdido o gene *env* ou foram os retrovírus que ganharam (Pélisson *et al.*, 1997)?

As similaridades moleculares entre o grupo *gypsy* e os retrovírus de vertebrados e invertebrados sugerem que os retrovírus se originaram do mesmo elemento do tipo *gypsy* que posteriormente adquiriram o gene *env*. Porém, a hipótese de que algum retrovírus tenha se tornado defectivo pela inativação deste gene tornando-se um elemento *gypsy* atual também não está descartada (Pélisson *et al.*, 1997).

Embora as técnicas de biologia molecular permitam um nível de entendimento mais profundo dos processos biológicos, os mecanismos evolutivos que originaram os elementos de transposição não estão bem definidos. O fato de existirem sequências que possuem a capacidade de se mover no genoma já está bem documentado, porém algumas questões que permeiam a existência, permanência e a evolução destes elementos genéticos nos organismos permanecem ainda obscuras.

Existe a hipótese de que os elementos móveis dos genomas são simplesmente entidades parasitas que prosperam nos genomas porque eles se auto-replicam e possuem numerosos locais seguros para se refugiar tanto dentro como entre genes. Por outro lado, a hipótese de que os elementos móveis prosperam nos genomas porque eles beneficiam seus hospedeiros está cada vez mais sendo sustentada por evidências experimentais. Esta hipótese foi sugerida desde que estes elementos foram descobertos por McClintock em 1951. Neste modelo, o efeito deletério da transposição poderia ser minimizado pela manutenção de elementos ativos no estado imóvel durante o crescimento normal do organismo. Em

situações especiais, os elementos poderiam ser ativados, aumentando desta forma a taxa de mutação e reestruturando o genoma. As populações capazes de diversificar seus genomas rapidamente desta maneira poderiam sobreviver mais facilmente, produzindo assim descendentes mais aptos (Grandbastien *et al.*, 1994).

A característica fundamental de todos os elementos de transposição é a sua habilidade de se inserir em diferentes posições no genoma e de alterar ou não a função dos genes aos quais ele se associa. No entanto, através da criação de variabilidade genética, eles podem desenvolver um importante papel como fonte da plasticidade genômica necessária para a evolução. Os retrotransposons, cujo o ciclo de transposição inclui um intermediário citoplasmático, podem se transpor para locais que não estão ligados ao sítio original de inserção, representando uma alternativa interessante para os convencionais transposons (Grandbastien *et al.*, 1994).

A transposição não é um processo ao acaso, sendo controlada por vários sistemas regulatórios originários do próprio elemento, do organismo hospedeiro e de sinais externos (Grandbastien *et al.*, 1994). O primeiro, e mais bem estudado passo na regulação da retrotransposição é a transcrição. Esta etapa controla tanto a produção do RNA genômico, utilizado como molde para a transcrição reversa, como a produção de tipos de RNA envolvidos na síntese de proteínas estruturais e catalíticas necessárias para a retrotransposição. A importância do controle transcricional é ainda mais acentuada pelo fato que, em muitos casos documentados, a indução transcricional do elemento está diretamente correlacionada com a sua habilidade de mutar o gene no qual ele se insere (Grandbastien *et al.*, 1994).

A transcrição de retrotransposon em *Drosophila* é regulada por padrões temporais, tecido específicos e hormonais. Além disso, pode também depender do gene no qual ele estiver inserido (Corces & Geyer, 1991). A regulação pós-transcricional também é um importante

componente no controle da retrotransposição. Este controle pode agir em nível do processamento ou estabilidade de proteínas. A eficiência de leitura necessária para a produção de proteínas catalíticas também deve ser um ponto crítico na regulação da transcrição. Outro ponto chave na regulação da retrotransposição deve ser o controle do pareamento do mRNA com o primer para a síntese de DNA por fatores da célula hospedeira (Grandbastien *et al.*, 1994).

Considerando-se que os retrovírus requerem proteínas catalíticas em *cis*, os retroelementos também devem apresentar esta exigência. Assim, o movimento de elementos defectivos seria reduzido, minimizando o efeito mutagênico dos retrotransposons. Parece, então, que existem regras gerais para um controle exato da atividade dos retroelementos, as quais seriam fundamentais para preservar a viabilidade destes elementos nos genomas. O modo pelo qual este controle é estabelecido parece, entretanto, ser distinto para cada caso, sendo provavelmente resultado de uma longa co-evolução de cada família de elemento com o seu organismo hospedeiro (Grandbastien *et al.*, 1994). Será que existe uma regra geral de evolução para os genes, cromossomos e elementos móveis dentro de cada organismo? Ou estes constituintes celulares estão sujeitos a diferentes regras?

Tem sido sugerido que os retrotransposons evoluem 2-3 vezes mais rapidamente que os loci nucleares convencionais (Purugganan & Wessler, 1994). A taxa de mutação das sequências dos retrotransposons deve diferir significativamente da taxa de genes nucleares, pois a transcriptase reversa que é a enzima responsável pela replicação destes elementos não possui atividade de reparo (Skalka & Goff, 1993). A evolução dos retrotransposons deve ser governada por acúmulos de mutações devido à replicação celular e também por substituições maiores ocasionadas por eventual retrotransposição (Purugganan & Wessler, 1994). Várias espécies de plantas possuem sequências de transcriptase reversa altamente

divergentes dentro do seu próprio genoma. A heterogeneidade destas sequências em parte é atribuída à alta taxa de mutação associada com a retrotransposição.

A taxa de mutação durante um ciclo de transposição do retrotransposon *Ty1* de levedura foi estimada em 2.5×10^5 , que é tão alta como dos retrovírus (Gabriel *et al.*, 1996). A população de RNA do elemento *Tnt1* de tabaco é altamente variável, pois em análises onde foi amplificado por PCR um fragmento de 380 nucleotídeos do RNA de *Tnt1*, a maioria dos clones amplificados são diferentes (Casacuberta *et al.*, 1995). Se um nível de variabilidade semelhante ocorrer dentro dos 5.2kb do restante do RNA do *Tnt1*, pode ser muito raro encontrar duas moléculas de RNA do *Tnt1* idênticas (Duarte *et al.*, 1994). O conjunto destas moléculas originam uma população de RNA viral que vem se adaptando no decorrer da evolução do organismo hospedeiro. A este conceito é dado o nome de 'quasispecie', que foi desenvolvido para o entendimento da dinâmica populacional do RNA viral (Casacuberta *et al.*, 1997). Considerando-se que os retrotransposons possuem uma taxa de mutação elevada, assim como os retrovírus, poderíamos também considerar que eles são uma 'quasispecie'?

O elemento *Tnt1* de tabaco é um bom exemplo para se avaliar a hipótese da existência de uma população 'quasispecie' dentro dos retrotransposons, pois ele é um dos poucos retroelementos ativos em plantas. Além disso, este retroelemento está presente em um alto número de cópias no genoma de tabaco, com sequências bem heterogêneas. Como a atividade do *Tnt1* é baixa e ele possui um alto número de cópias, pode-se deduzir que grande parte das cópias sejam defectivas (Casacuberta *et al.*, 1997).

Considerando-se que a retrotransposição é um processo replicativo o número de elementos ativos tende a aumentar exponencialmente. Se este processo for ocorrendo dentro de um organismo, sem nenhum controle,

estes elementos seriam deletérios para o organismo hospedeiro. Um dos possíveis mecanismos que exerce este controle é a mutação de alguma sequência do elemento, já que a taxa de mutação é bastante alta entre os retrotransposons (Casacuberta *et al.*, 1997).

Durante a retrotransposição do *Tnt1* frequentemente ocorrem deleções ou mutações em sequências regulatórias do elemento, originando um retrotransposon defectivo. Nos eventos de transcrição, a transcriptase reversa deve produzir cópias ativas e inativas, formando assim uma população de moléculas de *Tnt1* intimamente relacionadas, mas diferentes em sequência. Esta população heterogênea de moléculas pode aproximar-se da 'quasispecie' dos retrovírus. Algumas destas moléculas podem ter um maior valor adaptativo, tornando-se bem sucedidas na co-evolução com o genoma hospedeiro. Então, é possível que o *Tnt1* possua uma estrutura populacional semelhante às 'quasispecies', o que poderia lhe conferir uma alta capacidade adaptativa (Casacuberta *et al.*, 1997). A taxa de mutação dos retroelementos, de uma maneira geral, deve ser parecida com a do *Ty1* de levedura, pois todos eles dependem da transcriptase reversa que é propensa a erros nos processos de síntese de qualquer organismo. Assim, tem sido sugerido que os retrotransposons de uma maneira geral poderiam ser 'quasispecie' (Casacuberta *et al.*, 1997).

A atividade dos retrotransposons de plantas provavelmente foi muito alta no passado, mas parece ser extremamente baixa nas plantas modernas, pois a maioria dos retrotransposons presentes no genoma de plantas representam elementos defectivos (Wessler *et al.*, 1995). No entanto, poucos elementos ativos, como o *Tnt1*, seriam suficientes para gerar uma população de RNA 'quasispecie' (Casacuberta *et al.*, 1997).

O impacto dos retroelementos na estrutura genômica dos organismos

De acordo com Heslop-Harrison *et al.* (1997), as modificações nas sequências de DNA que ocorreram durante a evolução do genoma de

eucariotos não podem simplesmente ser atribuídas a substituições de bases. Algum processo mutacional mais complexo deve ter ocorrido. Tem sido sugerido que os elementos de transposição, e em especial os retroelementos, seriam uma importante força evolucionária que contribui continuamente para a duplicação, dispersão e rearranjo de sequências no genoma eucarioto (Weiner *et al.*, 1986).

Tem sido sugerido que os elementos móveis ou seus remanescentes perfazem a maioria dos componentes do DNA repetitivo em eucarioto (Flavell, 1986; Wright *et al.*, 1996). Este DNA repetitivo entre genes não é uma massa desorganizada entre os genes e sim uma composição de retrotransposons intactos e organizados de uma maneira simples (SanMiguel *et al.*, 1996). Desta forma, a variabilidade de tamanho dos genomas das várias espécies estaria bastante relacionado com a abundância e com o arranjo dos retroelementos em relação aos genes. O aumento no tamanho do genoma de plantas deve estar intimamente relacionado com a transposição replicativa e não com a excisão dos retroelementos (Wright *et al.*, 1996). Assim, os elementos que se transpõem via um intermediário de RNA possuem mais cópias do que os elementos que se transpõem via DNA.

A família *Alu* de retroposons representa ao menos 5% do genoma de primatas (Deininger *et al.*, 1992). O genoma do milho possui 78% de DNA repetitivo (Bureau & Wessler, 1994a), desta porcentagem aproximadamente 50% tem sido estimado como sendo composto de elementos altamente e medianamente repetitivos e de baixo número de cópias (SanMiguel *et al.*, 1996). Os blocos de diferentes misturas destes elementos com 20-200 kb são espalhados pelo genoma do milho, que são enriquecidos pelas regiões intergênicas hipermetiladas (Miller *et al.*, 1997). Em contraste com o genoma de milho, em cevada apenas um retroelemento foi encontrado em um pedaço de 60kb (Panstruga *et al.*, 1998). Em lírio, tem sido estimado que os retroelementos *del2* constituem

4% do genoma desta espécie (Gierl & Saedler, 1992). A família de retroelementos *Athila* representa 0.3% do genoma de *Arabidopsis*, enquanto que a família *Ta* representa 0.1% do genoma desta espécie (Pélissier *et al.*, 1995; Konieczny *et al.*, 1991). O retrotransposon *BisI* representa 5% do genoma de trigo (Moore *et al.*, 1991). Os elementos de transposição podem constituir até 10% do genoma do homem, de rato e de *Drosophila* (Pélissier *et al.*, 1995). O genoma mitocondrial de *Arabidopsis* possui 372kb, dos quais 5% é constituído de sequências semelhantes à retrotransposon do tipo *copia*, *gypsy* e *LINE* (Knoop *et al.*, 1996).

Considerando-se o milho como exemplo, onde no genoma existem múltiplas famílias de retroelementos com baixo número de cópias cada uma, poderíamos imaginar quantas mil ou milhões de distintas famílias de retroelementos devem existir em um único organismo desta espécie. Em contraste, espécies com genoma pequeno e compacto como *Arabidopsis* geralmente possuem poucas famílias de elementos móveis, com um baixo número de cópias (Miller *et al.*, 1997). Portanto, foi sugerido que a variação espécie-específica no número de cópias de elementos de transposição pode ser responsável pela variação no tamanho do genoma de plantas, e conseqüentemente ter um papel importante na diversificação das espécies (Miller *et al.*, 1997). Assim, os elementos móveis poderiam contribuir para a evolução do genoma das plantas (Grandbastien, 1992).

Análises por PCR de domínios da transcriptase reversa de elementos do tipo *copia* de algumas variedades de arroz indicaram que estes elementos estão presentes em um número de cópias que varia de moderado a alto, em todo o genoma desta espécie. No entanto, foi detectado polimorfismo entre as quatro diferentes variedades de arroz *indica* comparadas com o grupo das quatro variedades *japonica*, polimorfismo este capaz de distinguir nitidamente os dois grupos. Os resultados sugerem que a heterogeneidade de sequências e a variabilidade de distribuição dos

retrotransposons podem ser um dos fatores que contribuíram com a diversidade genética em arroz (Wang *et al.*, 1997).

Durante um recente processo evolutivo das espécies de *Cruciferae* foi observado uma importante explosão de amplificação do retroposon *SI* específico para cada espécie. Esta explosão sugere que a retroposição do *SI* representa um processo dinâmico podendo contribuir para rearranjos genômicos, que eventualmente levaram ao isolamento reprodutivo das espécies deste grupo (Lenoir *et al.*, 1997).

Os retroelementos não estão presentes somente em genomas grandes como milho, cevada e lírio. Também participam de genomas menores de plantas, como *Arabidopsis*. Tem sido sugerido que a diferença de tamanho dos genomas maiores para os menores é a variedade e o número de cópias dos elementos que são usualmente muito baixas, pois o número de genes é muito semelhante (Heslop-Harrison *et al.*, 1997). Os genomas grandes possuem retroelementos altamente repetitivos e de diferentes famílias, em um número de cópias completamente variado, como é o caso das famílias dos retroelementos altamente repetitivos de milho *Opie*, *Cinful*, *Grande*, *Huck* e *Ji*, que perfazem mais de 25% do genoma de milho. Embora estes elementos possuam esta alta participação no genoma, as suas sequências apresentam pouca homologia com as sequências do banco de dados de milho, este fato sugere que especificamente estes elementos evitam inserção em genes (SanMiguel *et al.*, 1996). Em contraste com alguns DNAs móveis de baixo número de cópias, como o *Mu1*, que preferencialmente se insere em genes (Cresse *et al.*, 1995). Talvez, os retrotransposons altamente repetitivos possam existir apenas se eles se inserirem em regiões intergênicas. Caso contrário, a célula hospedeira poderia atingir um nível letal de mutação (SanMiguel *et al.*, 1996).

Genomas eucariotos simples, como de *Arabidopsis*, nematóides e levedura, primariamente consistem de genes justapostos de modo compacto misturados com raros DNAs móveis. O genoma de *Arabidopsis* possui 70-

145Mpb com relativamente pouco DNA repetitivo (Leutwiler *et al.*, 1984 em Thykjaer *et al.*, 1997). Nesta espécie, os genes estão bem próximos, pois foram identificados um gene a cada 5kb no cromossomo 4 (Blackbourn & Ingram, 1996 em Thykjaer *et al.*, 1997). Em contraste, o genoma de ervilha é 30 à 40 vezes maior do que de *Arabidopsis*, consistindo de até cerca de 70% de sequências repetidas distribuídas pelo genoma, deixando pequenos trechos para sequências simples (Murray *et al.*, 1978). No genoma de cevada, foi estimado que provavelmente existe em média um gene a cada 20kb (Panstruga *et al.*, 1998)

As regiões eucromáticas do genoma de *Drosophila* também são pobres em repetição e rica em genes, mas as β -heterocromatinas consistem de sequências repetidas em “tandem” e sequências variáveis de DNA móvel, fragmentadas e dispersas entre os genes isolados (Gatti & Pimpinelli, 1992). O fato dos retroelementos fazerem parte dos DNAs repetitivos, que podem estar localizados dentro de regiões heterocromáticas, não prova necessariamente que eles estejam biologicamente inativos, pois vem sendo demonstrado que a heterocromatina é bem mais complexa do que se imagina, não sendo algo geneticamente inerte. Um exemplo de heterocromatina de sequências medianamente repetidas é o de *Drosophila* que consiste de ‘ilhas’ de atividade transcricional (McDonald *et al.*, 1997). A heterocromatina constitutiva de *Drosophila melanogaster* representa aproximadamente 30% do genoma, sendo que esta é particularmente constituída de retroelementos (Dimitri, 1997). Os retrotransposons do tipo *copia* de *Allium cepa* estão distribuídos na eucromatina de todos os cromossomos, mas existe uma maior concentração em regiões heterocromáticas terminais (Pearce *et al.*, 1996).

Alguns retrotransposons com um alto número de cópias, parecem ter preferência por se inserir em outro elemento de transposição. O retrotransposon *Zdell* foi caracterizado porque uma cópia de outro

retrotransposon, o *Grande* 1-4 estava inserido nele (Vicient & Martínez-Izquierdo, 1997). Este é o caso também do *Tp1* de *Physarum*, que se inseriu em outro *Tp1* (Rothnie *et al.*, 1990). O retroelemento *RIRE1* de arroz, também se inseriu dentro de um outro membro da mesma família (Noma *et al.*, 1997). O elemento *Stowaway* de milho foi encontrado por se inserir no *Tourist* (Bureau & Wessler, 1994b). Já o retroelemento *PREM2* de milho só foi caracterizado por estar inserido dentro de um elemento *PREM1* (Turcich *et al.*, 1996). Em outros retroelementos de milho, descritos por SanMiguel *et al.* (1996), foi observado que os retroelementos medianamente e altamente repetitivos tendem a se inserir em retroelementos pré-existent e também nos espaços intergênicos. Aparentemente, os retroelementos com alto número de cópias evitam se inserir em regiões genômicas essenciais para a planta, como os genes, tentando ser o menos deletério possível para o genoma hospedeiro (Vicient & Martínez-Izquierdo, 1997). Em contraste, Hirochika *et al.* (1996) encontraram o retrotransposon *Ty1* de arroz inserido em quatro posições distintas, de três sequências de genes cópia simples e em apenas uma em DNA repetitivo. Estes dados indicam que diferentes sub-famílias de retrotransposons podem comportar-se diferentemente, tanto com relação à amplificação, como ao local de inserção (Heslop-Harrison *et al.*, 1997).

De uma maneira geral os retroelementos não possuem sequências alvos preferenciais no genoma, no entanto as família de elementos invertidos repetidos *Stowaway* e *Tourist* possuem uma certa preferência de inserção em sítios TA (Bureau & Wessler, 1992, 1994a). Este tipo de preferência por sequência é também característico de uma família de transposons de *Caenorhabditis* (Doak *et al.*, 1994). Em levedura, os retrotransposons *Ty1* e *Ty3* possuem preferência para integrar em regiões acima de genes de tRNA ou em outro genes transcritos pela RNA polimerase III. Os estudos desta preferência indicaram que a cromatina

influencia esta escolha pela integração do *Ty3* com os aparatos da polimerase (Zou & Voytas, 1997).

Como pode ser verificado, os elementos de transposição têm uma ampla participação nos genomas, contribuindo para um aumento significativo de seu tamanho e também na geração de mutantes. Tem sido considerado que os retroelementos desenvolvem uma importante função na geração de novos padrões de variabilidade e de especiação, contribuindo de certa forma para a geração da biodiversidade em plantas (Kumar *et al.*, 1997; Heslop-Harrison *et al.*, 1997).

Evidências de que os elementos de transposição possuem outras funções no genoma sem ser a de afetar a expressão de genes têm sido encontradas. Em *Drosophila*, foi identificado o primeiro exemplo de elemento de transposição com função definida na estrutura cromossômica. Os retroposons *HeT-A* e o *TART* são retroelementos presentes nos telômeros dos cromossomos de *Drosophila*, sendo restritos a estas regiões. Estes retroelementos parecem agir na célula prevenindo o desgaste das extremidades do cromossomo, além de auxiliar na regulação da divisão celular (Pardue *et al.*, 1997). Os elementos *LINE1* parecem agir no reparo de quebras cromossômicas (Hutchison *et al.*, 1989 em Pardue *et al.*, 1997). Em levedura, foi demonstrado que, na ausência de recombinação homóloga, a quebra da fita dupla do cromossomo pode ser reparada por retroelementos (Moore & Haber, 1996). Também foi observada a associação de retrotransposons do tipo *copia* com regiões heterocromáticas terminais de *Allium cepa*, que talvez estejam auxiliando na estabilidade dos cromossomos (Pearce *et al.*, 1996).

O impacto dos retroelementos na evolução gênica

A hipótese de que os elementos móveis do genoma afetam dramaticamente a expressão de genes surgiu da observação de sementes de milho com fenótipo alterado e por análises citológicas (McClintock, 1951).

Portanto, desde então têm-se atribuído aos elementos móveis do genoma a principal função de criador de variabilidade genética frente a situações estressantes. Atualmente, outras funções têm sido atribuídas aos retroelementos. A franca associação deles com genes têm sugerido a contribuição destes elementos com o fornecimento de sequências regulatórias para os genes no decorrer da evolução. Se esta contribuição realmente ocorrer, os genes estariam sendo beneficiados pela transposição replicativa dos retroelementos, que pode distribuir as sequências regulatórias em vários locais do genoma.

Robins & Samuelson em 1992 descreveram uma possível contribuição dos retrotransposons na evolução da regulação gênica nos cromossomos de vertebrados. Evidências para esta contribuição foram descritas em *Drosophila* (Miller *et al.*, 1995) e em plantas (White *et al.*, 1994). O mecanismo molecular que fundamenta estas mutações regulatórias mediadas por retrotransposons são variadas e diversas (McDonald *et al.*, 1997). Em alguns casos, foi observado que as sequências regulatórias do gene, como sítio de iniciação e terminação da transcrição ou ainda sítios de ligação de proteínas, foram derivadas de elementos de transposição (Marillonet & Wessler, 1997).

Estudos da regulação gênica em eucariotos indicam que o padrão geral da iniciação da transcrição resulta de efeitos aditivos de sequências regulatórias em *cis*. Este padrão de construção em bloco para as sequências envolvidas na regulação gênica explica porque os elementos de transposição são capazes de reduzir ou alterar a iniciação da transcrição e assim produzir novos padrões de expressão. Os movimentos de excisão e inserção de elementos de transposição na região promotora podem deletar ou rearranjar sequências regulatórias em *cis*. Além disso, a inserção do elemento em sequências flanqueadoras 5' pode posicionar os promotores do elemento próximo ao 'TATA box' de genes adjacentes. Esta justaposição pode alterar dramaticamente a expressão gênica, uma vez que

o sítio de ligação da proteína envolvida na transcrição e transposição do elemento pode agora tornar-se um novo módulo promotor agindo em *cis*, o que pode influenciar a expressão do gene adjacente. A maioria das interações transcripcionais entre os elementos de transposição e os genes é provavelmente governada por processos comuns aos genes de planta. Até mesmo a metilação dos elementos pode alterar não somente a sua expressão, como a de genes adjacentes a eles (Weil & Wessler, 1990).

Pesquisas de similaridade com sequências do retroelemento *Hopscotch* e de outros retroelementos do tipo *copia* de milho com sequências nos banco de dados GenBank e EMBL revelaram que 21 genes normais de plantas presentes nestes bancos possuem restos de retrotransposons do tipo *copia* em regiões flangeadoras de genes, tanto 5' como 3' (White *et al.*, 1994). Os elementos do tipo *Tourist* foram encontrados em introns ou em sequências flangeadoras de 23 genes de milho e em um de cevada. Também foram encontrados elementos *Tourist* em associação com genes selvagens de duas outras gramíneas, arroz e sorgo (Bureau & Wessler, 1994a). Outra família de pequenos elementos invertidos e repetidos que está associado com genes é a dos *Stowaway* . Esta família foi encontrada em associação com mais de 40 genes de plantas listadas no GenBank e no EMBL (Bureau & Wessler, 1994b).

Através de pesquisa no GenBank foram encontradas sequências com alta similaridade à LTR ou regiões internas do *PREM2* nas proximidades de 6 sequências genômicas de milho. Entre estas estão 3 genes nucleares de poligalacturonidase que são expressos em pólen, a subunidade A do gene da desidrogenase gliceraldeído fosfato, o gene nuclear que codifica a chaperonina 60 mitocondrial e também a sequência genômica não-codificadora de milho que tem propriedades de replicação autônoma em levedura (ARS3) (Turcich *et al.*, 1996). No gene da chaperonina 60, a LTR 5' do *PREM2* está localizada na região 5', a aproximadamente 450pb do primeiro exon. Na sequência ARS3, o fim da LTR 3' está localizada um

pouco antes desta sequência, aparentando ser a terminação 5' do ARS3. A mesma região *pol* do **PREM2** foi encontrada em posição idêntica na região 5' de três membros da família multigênica da poligalacturonase. Em um dos genes, a região do **PREM2** foi encontrada a 326pb do início da transcrição.

Um fato bastante interessante é que nenhuma das seis inserções descritas para o **PREM2** ocorreu na região codificadora de genes. Em todos os casos, as sequências **PREM2** são encontradas a pequena distância acima da região promotora (Turcich *et al.*, 1996). Estes genes poderiam então estar usando as sequências do **PREM2** como sequências regulatórias? Possivelmente sim, já que em outros trabalhos têm sido identificadas sequências críticas para a expressão de genes eucariotos dentro das LTRs de diferentes retroelementos (McDonald, 1990). A presença de uma mesma sequência **PREM2** exatamente na mesma posição acima da região promotora de três genes da poligalacturonase levantou as suspeitas do envolvimento deste elemento na evolução desta família gênica. Foi sugerido que este retroelemento poderia estar facilitando a ocorrência de algumas das duplicações gênicas que deram origem a família multigênica (Turcich *et al.*, 1996). Então, a existência de um elemento facilitador da duplicação gênica seria mais uma possível função dos retroelementos nos genomas, quem sabe um dos mecanismo criadores de famílias multigênicas.

Nas adjacências do gene da glutamina sintetase (*Gln1*) de *Lotus japonicus* foi encontrado um retroelemento incompleto do tipo *copia*, o *dRtp1*. Este elemento estava 2.9kb acima do sítio inicial da transcrição. Neste caso não se pode afirmar que o elemento esteja fornecendo sequência regulatória ao gene devido à grande distância que ele se encontra do promotor (Thykjaer *et al.*, 1997).

Três eventos de inserção do retrotransposon *Tnt1* no gene da enzima nitrato redutase de *Nicotiana tabacum* resultaram em mutantes com a

produção de RNA quiméricos. Os transcritos destes mutantes eram constituídos pelo mRNA da NR contendo a sequência do *Tnt1*, além da expressão de transcritos truncados devido ao término da transcrição ocorrer dentro da LTR do *Tnt1* (Pouteau *et al.*, 1991).

Em tomate, a família gênica aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase participa da via biosintética para formação do etileno, que é um importante fitohormônio envolvido no controle de muitos eventos no desenvolvimento da planta e respostas à variações no ambiente. Em dois genes da oxidase, *LEACO1* e *LEACO-3*, envolvidos nesta via foram encontradas inserções de elementos móveis da classe I e II. Na região flanqueadora 5' do *LEACO1* foi encontrada uma inserção de um típico retrotransposon. Sequências semelhantes à este elemento também foram encontradas em outros genes de tomate. Como o gene *E4*, que é um promotor da resposta ao etileno, e também o gene *2A11*, que é específico do fruto. Hibridizações com as sequências do retroelemento demonstraram que este é altamente repetitivo no genoma de *Lycopersicon esculentum*. No gene *LEACO3* existem duas inserções de elementos semelhantes aos *Stowaway*, uma delas na região flanqueadora 5' e a outra no intron 3. Sequências semelhantes a este elemento invertido repetido também foram encontradas por pesquisa em banco de dados nos genes *Win2*, gene induzido por fermento em batata e no gene *Adh2* de tomate (Blume *et al.*, 1997).

Os retrotransposons são responsáveis por cinco das seis mutações insercionais espontâneas estáveis do gene *waxy* de milho (Varagona *et al.*, 1992; Puruggannan & Wessler, 1994; White *et al.*, 1994). Surpreendentemente, três destes cinco alelos - *wx-Stonor*, *wx-G* e *wx-B5* - codificam alguma proteína WX com atividade enzimática, embora possuam elementos de 4.5kb, 5.6kb e 6.1kb inseridos em diferentes introns (Varagona *et al.*, 1992). Nos três alelos, a fraca expressão do gene *waxy* no endosperma resulta na síntese de transcritos selvagens após a retirada dos

elementos junto com os introns, durante o processamento do mRNA. Embora cada alelo produza mRNA selvagem, eles também produzem transcritos alternativos que são resultantes da retirada de exons próximos aos elementos (Marillonnet & Wessler, 1997). O alelo *wx-G*, por exemplo, produz 30 vezes mais atividade enzimática no pólen do que no endosperma. Este alelo representa um dos poucos exemplos de processamento diferencial para expressão tecido-específica em plantas. Além de ser um exemplo inusitado de que a inserção de retroelemento em região codificadora de um gene pode causar uma alteração da expressão tecido-específica (Marillonnet & Wessler, 1997).

O processamento de mRNA alternativo para a expressão tecido-específica tem sido descrita em vários animais, enquanto que poucos exemplos são conhecidos em plantas. Recentemente, processamento alternativo tecido-específico foi demonstrado no gene da proteína H de *Flaveria trinervia* (Kopriva *et al.*, 1995) e o gene *chorismate synthase* de tomate (Gorlach *et al.*, 1995). Nestes dois casos não se sabe se o processamento alternativo do mRNA resulta em consequências fisiológicas ou regulatórias. Em contraste a estes dois genes selvagens que sofrem processamento alternativo, o alelo *wxG* é mutante de um gene que normalmente não sofre processamento alternativo. As avaliações deste alelo indicaram que o processamento alternativo do mRNA para expressão tecido-específica é semelhante em plantas e animais (Marillonnet & Wessler, 1997).

No trabalho de Marillonnet & Wessler (1997) ficou evidente que o alelo *wx-G* tem sua expressão alterada em tecidos específicos devido ao processamento alternativo do mRNA, que por sua vez é ocasionado pela inserção de um retroelemento. Estudos prévios haviam demonstrado que a inserção ou excisão de elementos de transposição na região flanqueadora 5' ou em sequências líderes não-traduzidas (URL) podem alterar os parâmetros temporais e/ou espaciais de transcrição (Weil & Wessler,

1990). Como o exemplo da excisão do elemento *Tam3* de *Antirrhinum* da posição -70pb do sítio inicial da transcrição do gene *pallida*, que gerou alelos com padrões alterados de pigmentação floral (Coen *et al.*, 1986). Fenômeno semelhante ocorreu no gene da *Adh1* de milho, onde a excisão do elemento *Ds1* da região URL proporcionou um maior número de moléculas de mRNA no pólen comparado ao escutelo e raízes anaeróbicas (Dawe *et al.*, 1993).

Em 1994, Turcich & Mascarenhas descreveram o primeiro exemplo de expressão tecido-específica de um retroelemento de plantas. Este elemento foi denominado de *PREMI*, retroelemento de pólen de milho, que se expressa nos micrósporos durante o desenvolvimento do pólen. A expressão de elementos móveis nesta fase do desenvolvimento da planta tem aspectos interessantes, pois as mudanças genéticas que venham a ocorrer podem ser herdadas. Por outro lado, se a alteração for deletéria, inviabilizando o grão de pólen, ela não será nem percebida, pois existe sempre um excesso de gametas masculinos.

Outros exemplos têm contribuído para ampliar os conhecimentos sobre as prováveis maneiras em que os elementos de transposição são capazes de diversificar a regulação gênica e potencialmente contribuir para a evolução da expressão gênica (Marillonnet & Wessler, 1997). Por exemplo, em estudos usando o retrotransposon *copia* de *Drosophila* como modelo, McDonald *et al.* (1997) concluíram que retroelementos podem ter a tendência de acumular pequenas duplicações dentro das LTRs e em regiões líderes não traduzidas. Estas duplicações podem ser geradas durante a replicação do retroelemento, pois são comuns erros durante o processo de transcrição reversa. Os ‘enhancers’ são basicamente compostos de uma série de pequenas sequências com domínios para ligação de proteínas regulatórias. A formação destes complexos ‘motifs’ dos ‘enhancers’ pode ser resultado de eventos de recombinação desigual entre retroelementos repetidos dentro do genoma. As regiões ‘enhancer’ de

retrotransposons e de retrovírus são usualmente localizadas dentro da LTR ou ULR. Os autores propõem que este teria sido um dos possíveis mecanismos evolutivos que teriam originado os 'enhancers' em eucariotos (McDonald *et al.*, 1997). Se os 'enhancers' realmente se originaram dos retroelementos, este acontecimento pode ser considerado um grande trunfo na evolução de sequências regulatórias dos genes, pois estas sequências podem ser simplesmente distribuídas aos diversos genes através da retrotransposição. Subsequentemente, cada gene pode ser selecionado com ou sem os 'enhancers', ou adaptações deles, que foram fornecidas pelo retroelemento (McDonald *et al.*, 1997).

Em geral, as teorias sobre a origem de novos genes durante a evolução se focalizam principalmente em regiões codificadoras dos genes. A duplicação gênica pode representar um local de experimentação de mutação, que pode alterar a função da proteína codificada sem perder a atividade da cópia original. Desta forma, o efeito deletério da troca seria reduzido, permitindo talvez a evolução de uma nova proteína com possíveis vantagens adaptativas. Foi observado que genes duplicados adotam frequentemente novas funções decorrentes muito mais por trocas em suas regiões de controle do que exclusivamente por alterações em suas sequências codificadoras. A hipótese de que mutações em regiões regulatórias de genes são mais responsáveis pela diversificação funcional dos genes do que as mutações em regiões codificadoras foi proposta por Jacob em 1977 (Miller *et al.*, 1997). A primeira evidência experimental para este modelo foi a demonstração de que genes de origem comum, mas distintos na sequência codificada, podem substituir um ao outro funcionalmente, quando expressos sob controle apropriado de sequências regulatórias no embrião (Li & Noll, 1994).

Como discutido por Palmgren (1994), os retrovírus de vertebrados podem, ocasionalmente e acidentalmente, adquirir de seu hospedeiro um gene celular ou um fragmento do gene, que não tem uma função no ciclo

de vida viral. Entretanto, a expressão do DNA capturado pode influenciar drasticamente as subsequentes células hospedeiras. O DNA hospedeiro adquirido e modificado dentro de um retroelemento poderia se expressar utilizando tanto o promotor da LTR como o promotor do gene no qual ele estiver inserido. Uma vez que o retrotransposon se transpõe via RNA, ele deve ser capaz de trocar parte de sua própria sequência com a sequência hospedeira, de uma maneira semelhante aos retrovírus. Um exemplo deste evento foi observado com o retrotransposon *Bs1* de milho, que adquiriu uma porção do gene que codifica a ATPase de membrana plasmática (*PMPA*). A aquisição deste segmento pode ter ocorrido por recombinação de RNA com um transcrito do ancestral do elemento *Bs1*. Isto pode ter ocorrido tanto por um evento de conversão gênica como por eventos duplos de recombinação. Análises de clonagem e hibridização de membranas com sequências de elementos *Bs1* indicam que vários outros elementos desta família possuem sequência do gene *PMPA* em milho, teosinte e tripsacum. Estes dados sugerem que o elemento *Bs* ancestral teria adquirido a sequência *PMPA* antes da divergência destas espécies, há mais de um milhão de anos atrás. O fato de que nenhum retrotransposon adquiriu parte de um gene celular, como os retrovírus frequentemente fazem, sugere que o *Bs1* pode atualmente representar uma forma proviral defectiva de um retrovírus. Este é o primeiro exemplo descrito de retrotransposon que adquiriu uma porção de um gene celular normal. A transdução de genes celulares pelos retrovírus tem sido observada em vários animais. Na maioria dos casos, o gene adquirido tem uma função oncogênica que fornece uma vantagem seletiva para a produção dos retrovírus (Jin & Bennetzen, 1994).

Como os retrotransposons de plantas podem ser ativados

Vários estudos têm demonstrado que, diferentemente dos elementos que se transpõem via DNA, os retrotransposons são muito pouco ativos. As

evidências são várias e entre elas podemos destacar o exemplo de arroz onde não ocorreu alteração no número de cópias de retrotransposons entre os diferentes cultivares até o momento. Em algumas espécies selvagens de arroz foi sugerida a presença de retrotransposons ativos, entretanto não foi observada uma evidência direta da retrotransposição (Hirochika, 1997).

Em estudos de retrotransposons de plantas têm sido verificado que, de um modo geral, eles se tornam ativos em situações muito específicas, que foram chamadas de ‘choque genômico’ por McClintock (1951, 1956), resultando em uma traumática recomposição do genoma. Tais mecanismos podem fornecer a plasticidade genômica necessária para a adaptação de situações não-usuais. Esta possibilidade de reestruturação em resposta a uma troca não programada poderia ser importante em plantas que não podem mover-se para escapar de estresses ambientais. Assim, os retroelementos desempenhariam um importante papel nas populações de plantas (Grandbastien, 1992).

Têm sido apresentadas evidências de que vários fatores ambientais podem levar à ativação dos retrotransposons, fatores estes associados à condições estressantes para a planta, tais como infecção por fungos ou vírus, ferimentos e condições de cultura de tecidos. Em tabaco, somente foi observada a ativação do promotor da LTR 5’ do retroelemento *Tnt1*, após a digestão da parede celular com um extrato de fungo para obtenção de protoplastos. Foi então sugerido que este retrotransposon pode ter sido ativado como uma resposta defensiva da planta (Pouteau *et al.*, 1991). A ativação do *Tnt1* também foi observada em plantas atacadas por vírus e bactéria (Grandbastien *et al.*, 1997). A ativação da transcrição ocorre dentro da região BII da região U3 da LTR, que esta região está associada com a sinalização da defesa em cascata (Vernhettes *et al.*, 1997). A região BII é constituída de repetições em ‘tandem’, de modo bastante semelhante aos ‘motifs’ envolvidos na ativação de vários genes de defesa em planta. A

ativação do *Tnt1* pode ocorrer também por fatores abióticos, como ferimento do tecido e aplicação de salicilato (Grandbastien *et al.*, 1997).

A atividade dos retroelementos *Tto1-2* de tabaco foi detectada em células de cultura de tecidos e em plantas regeneradas, mas não em células intactas de plantas normais. Estes elementos não somente foram detectados em nível molecular, como observou-se a ocorrência de aumento no número de cópias do *Tto* (Hirochika, 1993). Alguns anos depois, foi também demonstrado que a transcrição do *Tto1* foi ativada nas condições de cultura de tecidos e posteriormente elevada na formação de protoplasto (Hirochika *et al.*, 1996). O ferimento na folha de tabaco e tratamento com metil jasmonato também levam à expressão deste retroelemento. A expressão de RNA do *Tto1* após o ferimento foi mais induzida em folhas jovens do que em folhas mais velhas, sugerindo que a resposta ao ferimento é dependente de fatores do desenvolvimento ou fisiológico da planta. Experimentos de fusão da LTR do *Tto1* com o gene *GUS* revelaram que este retroelemento contém regiões regulatórias em *cis* que respondem ao ferimento e ao metil jasmonato. Embora ocorra a ativação de retroelementos sob condições estressantes, não se sabe se os retrotransposon ativados desta maneira são herdados em condições naturais. Recentemente foi demonstrado que o retrotransposon *Tto1* também pode ser ativado por infecção viral e ácido salicílico (Takeda *et al.*, 1998).

A ativação dos elementos *Tos10*, *Tos17* e *Tos19* de arroz foi detectada em cultura de células, mas não em plantas com crescimento normal. O mais ativo deles foi o *Tos17* e portanto o mais estudado. O número de cópias de *Tos17* aumentou significativamente com o período prolongado de cultura. O retroelemento *Tos17* apresentou uma certa preferência para inserir em sequências de cópia simples, apesar de que uma grande fração do genoma de arroz é constituída de DNA repetitivo (Hirochika *et al.*, 1996).

Embora o retroelemento *Bs1* de milho tenha sido isolado após a inserção no loco *Adhl*, sua atividade é limitada a condições muito especiais. Como foi o estresse causado pela infecção viral que precedeu a inserção neste loco (Grandbastien, 1992). Não somente a cultura de células representa um estresse para ativar retrotransposons, mas também infecções por fungos, bactérias e vírus (Wessler, 1996).

Os exemplos de ativação dos retrotransposons se restringem a situações externas ao organismo. Comportamento este bem distinto dos elementos que se transpõe via DNA que não necessitam de situações estressantes para se expressar. Como os retrotransposons de plantas estão presentes em alto número de cópias no genoma, em alguma fase da existência destes organismos a atividade de retrotransposição deve ter sido alta.

Descrição de alguns retrotransposon de plantas

Em sua maioria, os retrotransposons de plantas conhecidos foram descritos devido a análises de sequências de DNA, ao contrário da maioria dos transposons, que foram descritos por ocasionarem mutações. Uma das metodologias que está sendo muito empregada para a caracterização de retrotransposons de plantas é a amplificação de fragmentos via PCR utilizando-se primers da região PBS. Nesta região a sequência de nucleotídeos é bastante conservada entre os retrotransposons de plantas, que em geral corresponde à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina. Portanto, esta metodologia tem permitido a descrição de novos retroelementos.

Os retroelementos de plantas, em geral, são transcricionalmente inativos, possuem alta heterogeneidade de sequências e um alto número de cópias (Wang *et al.*, 1997). Como a maioria dos retroelementos de plantas descritos até o momento têm sido isolados como inserções inativas, pouco é conhecido do funcionamento destes elementos. Considerando-se que eles

são semelhantes aos retrovírus e aos retroelementos de animais e leveduras, o mecanismo de transcrição e transposição dos retroelementos de plantas deve ser muito parecido com os já caracterizados (Grandbastien *et al.*, 1994).

Até o momento, mutagênese insercional ocasionada por atividade de retrotransposição somente foi observada com o retroelemento *Bs1* de milho em 1985 (Johns *et al.*, 1985), com *Tnt1* de tabaco em 1989 (Grandbastien *et al.*, 1989), com o *Tnp2* de *Nicotiana* em 1992 (Vaucheret *et al.*, 1992) e com o *Tto1* de tabaco em 1993 (Hirochika, 1993).

Utilizando-se recursos de análises de sequências através de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ou através da alta repetição no número de cópias, vários outros retroelementos foram descritos. No entanto, não existem ainda evidências que estes elementos sejam capazes de se transpor. Uma evidência indireta de possível mobilidade do retroelemento *Wis2* de trigo foi detectada por polimorfismo insercional entre as plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos (Moore *et al.*, 1991). O contínuo estudo de retrotransposons do tipo *copia* em *Arabidopsis thaliana* indica que estes elementos não seriam mais capazes de se transpor. No entanto, os estudos de Voytas *et al.* (1992) mostram que muitas das famílias dos retroelementos identificadas estão presentes em um alto número de cópias no genoma de *Arabidopsis*, sugerindo uma atividade de transposição ao menos em alguma parte de sua história evolucionária.

Análises de regiões heterocromáticas do genoma de *Arabidopsis thaliana* permitiram a identificação de uma outra família de retroelementos nesta espécie, que foi denominada *Athila*. Estes retroelementos possuem 10.5kb e são flanqueados por LTRs de 1.5kb. Estas LTRs começam e terminam com nucleotídeos consensos de retrovírus 5'TG.....CA3'. Estes nucleotídeos compõem a terminação de 5pb invertidas e repetidas. O putativo PBS é complementar ao tRNA de glutamina e está a 3pb abaixo da

LTR5'. O PPT está acima da LTR3'. A caracterização das extremidades de um elemento *Athila* revelou a presença de uma duplicação de 5pb na sequências alvo do genoma hospedeiro. Os elementos desta família aparentemente possuíram mobilidade, pois estão presentes em alto número de cópias. Porém, atualmente eles estão inativos, pois não possuem a capacidade codante necessária para a retrotransposição, embora existam duas ORFs de função desconhecida entre as LTRs. A comparação de sequências de 11 elementos da família *Athila* demonstrou que estes retroelementos são bem conservados e as LTRs possuem alta homologia. (Pélissier *et al.*, 1995).

Os retrotransposons de *Lilium henryi*, os *dell-46* possuem 9.3kb. A LTR 5' possui 2406pb e a 3' possui 2415pb. As LTRs diferem uma da outra em 1.4% na sequência. O PBS de 18pb complementar a extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina está localizado próximo à LTR 5'. Acima da LTR 3' existe um putativo PPT de 12 purinas. Este elemento possui sequências para codificar proteases, transcritase reversa, Rnase H e integrase (Smyth *et al.*, 1989).

O genoma de tabaco contém o retrotransposon *Tnt1*, o qual foi isolado depois de transpor-se para o gene da nitrato redutase, inativando-o. Este retroelemento possui 5.3kb, sendo que as LTRs são de 0.6kb com a iniciação e terminação de nucleotídeos palindrômicos 5'TG...CA3'. O *Tnt1* possui o PBS com 18pb complementares à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina, logo abaixo da LTR 5'. O PPT utilizado para a síntese da segunda fita de DNA está localizado acima da LTR3' e possui 11 pb. Na região entre as LTRs existe uma única ORF correspondente a 1328 aminoácidos. A LTR do *Tnt1* contém a região promotora e algumas sequências regulatórias que induziram a expressão de um gene reporter. Foi verificado que a expressão do *Tnt1* pode ser induzida por vários fatores, tanto bióticos como abióticos (Grandbastien *et al.*, 1994).

A família de retrotransposon *Tos1-20* de arroz foi isolada pela técnica de PCR utilizando-se primers de sequências conservadas do PBS. Alguns destes elementos foram mais profundamente avaliados. O *Tos3* possui 5.2kb e suas LTRs possuem 115pb. O PBS é complementar a extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina. O PPT está localizado acima da LTR3'. As extremidades do *Tos3* são flanqueadas por 5pb diretamente repetidos em consequência da duplicação da sequência alvo. Esta família de retroelemento é encontrada em arroz cultivado e selvagem, mas não foi encontrada em milho e tabaco (Hirochika *et al.*, 1992). Todos os retrotransposons da família *Tos* estudados aparentam estar inativos sob condições normais de crescimento. Entretanto, o *Tos10*, *Tos17* e *Tos19* foram ativados em condições de cultura de tecidos. O *Tos17* possui 4.3kb e as LTRs 138pb. A LTR deste elemento, diferentemente de todos os retrotransposons de plantas, não termina com CA e sim com GA, mas inicia-se com os dinucleotídeos canônicos TG. A sequência do *Tos17* é flanqueada por 5pb diretamente repetidos em consequência da duplicação da sequência alvo durante a inserção do elemento no genoma. O *Tos17* possui o PBS homólogo à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina e o PPT com uma sequência de polipurina (Hirochika *et al.*, 1996).

Em cevada, o primeiro retrotransposon do tipo *copia* a ser descrito foi o *BARE1*. Este elemento possui 12kb com as LTRs de 1.8kb. As extremidades das LTRs possuem 6pb invertidos e repetidos, e são flanqueadas por 4pb diretamente repetidos do DNA hospedeiro. O PBS possui de 15-19 bases complementares à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina, que estão posicionadas após o término da LTR5'. O PPT está adjacente à LTR3' (Manninen & Schulman, 1993). O retrotransposon *BARE-ID* é um representante da família *BARE* que possui uma inversão na região 5' e uma deleção de domínios internos. O fragmento de 4.2kb que contém o *BARE-ID* possui dois putativos TATA

boxes, T1 e T2. O boxe T1 está localizado na base 222 e um putativo sítio 'cap' na base 263. O boxe T2 tem uma estrutura consenso com os promotores de genes de plantas. Este boxe está na base 578 com sinal 'cap' na base 612. O *BARE-ID* possui dois PBS complementares ao tRNA de metionina, mas não foi observado um PPT no fragmento de 4.2kb, onde este retroelemento foi caracterizado. O *BARE-ID* possui homologia aos retrotransposons *BARE1* de cevada e ao *Wis2* de trigo. A LTR do *Wis2* possui 74% de homologia com a LTR do *BARE1* (Shcherban & Vershinin, 1997).

RIRE1 é um retrotransposon de arroz selvagem, *Oriza australiensis*. Este retroelemento é do tipo *copia* e está presente com um extraordinário número de cópias neste genoma. A região interna do *RIRE1* possui 5.2kb com ORFs para codificar os genes *gag*, *pro*, *int*, *RT* e *RH*. As LTRs possuem 1.5kb que são flanqueadas por repetições diretas de 5pb. Como a LTR dos retroelementos possuem três regiões funcionais - U3, R e U5 - estas divisões funcionais foram procuradas dentro da LTR do *RIRE1*. Na posição 1053-1057 está uma sequência CCACT que é a mesma sequência promotora no vírus de sarcoma em Rous (RSV). Outra sequência promotora TATAA foi encontrada na posição 1079-1083. Na posição 1334-1487 da LTR do *RIRE1* existe um sinal de terminação (TTGT) que é utilizado na síntese de RNA retroviral (Noma *et al.*, 1997). É importante destacar que a variação de tamanho nas LTRs dos retrovírus ocorrem dentro da região U3 (Temin, 1981).

O retroelemento *Bs1* de milho foi identificado por inativar o gene da álcool desidrogenase (*Adh1*), devido a uma inserção no exon 9. O elemento *Bs1* é um defectivo, provavelmente derivado de um retrotransposon "autônomo" e apenas pode transpor com o fornecimento de uma transcriptase reversa em *trans*. Como o *Bs1* não codifica qualquer peptídeo com homologia convincente à transcriptase reversa, deduziu-se que ele seria um retrotransposon defectivo (Jin & Bennetzen, 1989). Por outro lado,

Johns *et al.* (1985) sugeriram que o *Bs1* poderia ser um retrotransposon altamente compacto, que possui múltiplas sequências de leitura e/ou eventos de processamento de RNA, que poderiam criar uma transcriptase reversa altamente divergente. Entretanto, como o *Bs1* foi identificado pela primeira vez como uma inserção no gene da *Adh1*, foi postulado que a ausência de uma potencial região codificadora de transcriptase reversa implica que a função de replicação deve ser fornecida por outro retroelemento em *trans*. Este outro retroelemento poderia ser um *Bs1* “autônomo” ou um outro retrotransposon agindo em *trans*. O retroelemento *Bs1* foi isolado devido a mutagênese insercional causada no locus da *Adh1* de uma linhagem de milho infectada pelo vírus do mosaico de cevada (BSMV). Este elemento é do tipo *copia* e possui 3.2kb, com as LTRs de 0.3kb. A região do PBS está localizada abaixo da LTR 5' e possui homologia à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina. O sítio de PPT está logo acima da LTR 3' (Jin & Bennetzen, 1989).

O retrotransposon *Zeon1* de milho foi identificado na caracterização de um rearranjo gênico mitótico do loco duplicado de zeína 27kDa. Este retroelemento medianamente repetitivo possui 7.3kb, sendo as LTRs com 649 e 663 pb. As LTR possuem 8pb invertidos e repetidos iniciando com 5'TG e terminando com CA3'. As LTR possuem putativas regiões regulatórias U3-R-U5. Como este retroelemento possui ORF apenas para *gag*, ele necessita de transcriptase reversa, Rnase H e integrase em *trans* para retrotransposição, portanto, ele é um elemento não-autônomo. O PBS do retroelemento *Zeon1* possui 9pb que são complementares à extremidade 3' do tRNA de lisina, localizado nas adjacências da LTR 5'. Um PPT típico de retrotransposon está próximo à LTR 3' (Hu *et al.*, 1995).

O segundo retroelemento completo de planta a ser descrito foi o *Hopscotch*. Este retroelemento possui 4.8kb, com as LTRs de 231pb. O PBS possui 18pb e localiza-se próximo a LTR 5' e o PPT na extremidade 3' (White *et al.*, 1994).

Os elementos *Tourist* representam uma grande família de pequenos elementos de 113-343pb que estão frequentemente associados aos genes de milho. Estes pequenos elementos excedem em quantidade a todos o elementos invertidos repetidos já descritos em eucariotos. Embora eles não possuam uma classificação definida, eles se equivalem muito aos elementos *Alu* de humanos, devido ao alto número de cópias, dispersão no genoma e a alta frequência de associação com genes. Os elementos *Tourist* possuem terminação invertida repetida conservada, são flanqueados por uma repetição direta de 3pb e aparentam ter um sítio alvo específico. Uma mutação no gene *waxy* (*wx-B2*) identificada há mais de 40 anos por Brink & Nilan (1952) foi caracterizada como sendo causada pela inserção de um elemento *Tourist* (Bureau & Wessler, 1992). A estabilidade do fenótipo mutante *wx-B2* em uma ampla variedade de background genético de milho indica que a excisão dos elementos *Tourist*, se esta ocorre, deve ser muito rara.

Um dos maiores retroelementos do gênero *Zea* é o *Grandel*, que possui 13.8kb com as LTR de 0.6kb. Este retroelemento pertence à família *gypsy* por causa da ordem de seus domínios protéicos. Ele está presente em mais de 1000 cópias neste gênero, sendo que a maioria destas cópias está altamente metilada. Embora o *Grandel* possua todas as ORFs necessárias para a transposição, ele não é funcional (Martínez-Izquierdo *et al.*, 1997).

Um outro retrotransposon transcricionalmente inativo em milho é o *Zdell*. Embora este elemento possua ORFs para *gag* e *pol*, além das LTRs, não foram encontradas evidências de sua atividade. Suas sequências são altamente metiladas nos tecidos de milho. O *Zdell* é semelhante ao retrotransposon *dell* de *Lilium henryi*. Por isso, este retroelemento de milho deve pertencer ao grupo *gypsy*, como o *dell* (Vicient & Martínez-Izquierdo, 1997).

O primeiro exemplo de um retroelemento com expressão tecido-específica em planta foi do *PREM1*. Por que expressa-se em micrósporos,

este elemento recebeu a denominação de retroelemento de pólen de milho. O *PREMI* pertence a uma família de elementos altamente repetitivos. A LTR do *PREMI* foi estimada estar presente em aproximadamente 10.000 - 40.000 cópias no genoma de milho. As sequências *PREMI* estão presentes em muito mais cópias no genoma de milho do que outros retroelementos, podendo ser comparável, neste aspecto, com o elemento *dell* de *Lilium henryi*. Durante os estudos de caracterização do *PREMI* encontrou-se outra família de elementos, o *PREM2*, com isto, os estudos com o *PREMI* foram interrompidos. Sendo assim, ainda não se sabe se este retroelemento é completo (Turcich & Mascarenhas, 1994).

O retroelemento *PREM2*, descrito por Turcich *et al.* (1996), pertence ao grupo *copia* e possui 9.4kb, contendo LTRs de 1.3kb. As LTRs possuem iniciação e terminação com os típicos nucleotídeos canônicos 5'TG....CA3', além da regiões U3-R-U5. Na região U3 existem dois putativos TATA boxes, nas posições 301 e 406. Também existem dois possíveis sítios de poliadenilação, provavelmente correspondendo à região R, nas posições 739 e 1194. Próximo a LTR 5' está o PBS com similaridade a extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina e adjacente a LTR 3' está o PPT. Este retroelemento também se expressa de maneira tecido-específica em micrósporos. Os transcritos de RNA deste elemento somente foram encontrados nos micrósporos, mas não em pólen ou qualquer outro tecido de milho. Foi estimado que o *PREM2* constitui aproximadamente 5% do genoma de milho. O *PREM2* é o primeiro caso reportado de um retroelemento completo de planta com expressão tecido-específica. A expressão do elemento *PREM2* em micrósporos é bastante interessante porque pode fornecer informações da transmissão genética do rearranjo genômico, que poderia ser causado pela retrotransposição (Turcich *et al.*, 1996).

O retrotransposon *Ji3* de milho é semelhante ao *PREM2*, eles possuem o mesmo PBS e também alta similaridade de sequências na região

R e U5 da LTR. A LTR deste elemento possui 1.1kb. O PBS está localizado logo abaixo da LTR5'. Este retrotransposon teve apenas a sua LTR5' descrita em análises de sequência de regiões flanqueadoras do gene *Adh1* de um contíguo de 280kb isolado de YAC (SanMiguel *et al.*, 1996).

O retrotransposon *magellan* de milho é um dos poucos elementos do tipo *gypsy* de planta, este elemento foi identificado com um baixo número de cópias em todas as espécies do gênero *Zea* e também em *Tripsacum andersonii*. O *magellan* possui 5.7kb, com a LTR 3' de 0.3kb. Esta LTR possui a pequena extremidade invertida repetida e a terminação com os dinucleotídeos canônicos 5'TG...CA3'. O *magellan* possui um PBS de 24pb complementar à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina, adjacente à LTR 5'truncada. O PPT possui 13pb e está localizado acima da LTR 3'. Os retroelementos do tipo *gypsy* em planta são poucos, entre eles estão o *del* de *Lilium henryi* e o *IFG7* de *Pinus radiata*, além do *magellan*. O genoma de *Lycopersicon* também contém várias cópias de sequências do tipo *gypsy*. Entretanto, apenas o elemento *magellan* mostrou evidências de transposição recente (Purugganan & Wessler, 1994).

Dentre os retroelementos de plantas já caracterizados, um dos maiores é o *BAGYI* de cevada que possui 14.4kb com as LTRs de 4202pb (LTR5') e 4208pb (LTR3'). As LTRs possuem 6% de diferença na sequência. Diferentemente de muitos retrotransposons, as LTRs do *BAGYI* não são flanqueadas por pequenas extremidades invertidas e repetidas (IRs) e sim por repetições imperfeitas e diretas (DRs). Estas extremidades consistem de 5pb, 5'-GTATG-3' e 5'-GTATT-3'. Imperfeições de 1pb nas IRs também já foram observadas no elemento *victim* de milho (SanMiguel *et al.*, 1996). As repetições foram provavelmente criadas após a inserção do retroelemento no genoma de cevada. A terminação da LTR em nucleotídeos canônicos (5'TG...CA3') é comum à maioria dos retroelementos descritos. No entanto, a LTR do *BAGYI* aparenta ter a terminação em 5'TG...CC3'. Próximo a LTR5' existe um potencial PBS

complementar à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina. O PPT está localizado logo acima da LTR3'. Na região interna das LTRs do *BAGYI* existem sequências codificadoras para os genes *gag*, *prot*, *RT*, *RNaseH* e *int*. A posição dos domínios proteicos indica que este retroelemento pertence à classe dos *gypsy*. Embora o *BAGYI* possua sequências codificadoras de genes para ativar a sua própria transposição, as poliproteínas não são funcionais devido à existência de sequências fora do quadro de leitura e codons de terminação. Portanto, é bem provável que o *BAGYI* seja um retroelemento inativo ou se a transposição ocorre, ela deve ser mediada por fatores agindo em *trans* (Panstruga *et al.*, 1998).

Os elementos de transposição no gene waxy de milho

A caracterização molecular de mutantes *waxy* forneceu as primeiras informações das lesões que originam os fenótipos mutantes em plantas, além de demonstrar que metade destes mutantes *wx* resultam da inserção de DNA no gene. Este fato, juntamente com a facilidade de identificação do fenótipo mutante fazem do gene *waxy* um excelente sistema para se estudar o efeito da inserção de elementos de transposição na expressão gênica em plantas superiores (Varagona *et al.*, 1992).

A clonagem do alelos *wx-m9* e *wx-844* levou ao isolamento dos elementos de transposição *Ac* e *En* (Fedoroff *et al.*, 1983; Pereira *et al.*, 1985). Em 1988, Wessler demonstrou que a inserção dos elementos da família *Ac/Ds* no *waxy* resulta tanto na perda total como parcial da função gênica. A excisão no tecido somático produz endosperma com clones de células com e sem amilose. Os 8 alelos *wx* estudados foram gerados por inserções do elemento *Ac* ou *Ds* em posições diferentes do gene. Esses alelos têm expressão diferenciada, produzindo variações na quantidade de amilose, tamanho e frequência dos setores revertentes do endosperma. A excisão em tecido germinal pode resultar na produção de um novo alelo, causado pelas diferentes posições que as cicatrizes podem estar. A

frequência na qual estes alelos são produzidos e a atividade do gene *Wx* são bem característicos em cada um dos 8 alelos (Wessler *et al.*, 1986). Também é observada a ocorrência da reversão germinal estável, como no alelo *wx-m7*, onde se encontram altas frequências de sementes com fenótipo completamente normal. Estes eventos mutacionais ocorrem devido a um aumento da atividade do *Ac* no primeiro núcleo triplóide do endosperma formado pela dupla fertilização. A transposição do elemento *Ac* antes ou logo após a fertilização originará endosperma completamente normal ou com grandes setores de amido normal (Schwartz, 1986).

Os estudos com o alelo *wx-m7* permitiram a observação do efeito de dosagem do elemento de transposição no fenótipo do endosperma. Onde sementes com uma dose do elemento apresenta mosaicos de áreas normais e mutantes. Com duas doses do elemento observou-se grandes setores normais e as regiões mutantes possuíam setores revertentes. Endospermas com 3 doses de *Ac* mostram poucas e pequenas manchas waxy (Schwartz, 1986). A baixa frequência de reversão em alelos bem caracterizados em milho demonstra que a reversão está associada a uma baixa frequência de excisão do elemento. Isto pode ocorrer basicamente devido à deleção interna do elemento autônomo (Schwarz-Sommer *et al.*, 1985).

Muitas das linhagens de milho, fenotipicamente selvagens para o gene waxy, possuem proteínas WX com aminoácidos adicionais. Estas alterações na proteína aparentemente não diminuíram a expressão deste gene. Desta forma, foi sugerido por Schwarz-Sommer *et al* (1985), que a inserção e subsequentes excisões dos elementos de transposição em plantas podem ser responsáveis pela evolução proteica deste loco.

O envolvimento de processamento alternativo de mRNA na presença de elementos de transposição levou à caracterização de vários mutantes waxy estáveis. Foi observado que de 17 mutantes, seis possuem grandes inserções de DNA, indo de 4.5 a 6.1kb (Wessler & Varagona, 1985). Destas seis mutações espontâneas bem caracterizadas no gene waxy, cinco

são resultantes da inserção de retrotransposons (Wessler & Varagona, 1985); Varagona *et al.*, 1992; Purugganan & Wessler, 1994; White *et al.*, 1994). No alelo *wx-B5* existe o retrotransposon **B5** de 6.1kb no intron 2. Na junção do intron 5 com exon 6 existe uma inserção de 5.2kb do elemento *Stonor*, gerando o alelo *wx-Stonor*. No alelo *wx-G* foi identificado o retrotransposon **G** no intron 8 de 5kb. Surpreendentemente, embora estes fragmentos ocorram no meio do gene ainda ocorre a produção de alguma atividade enzimática do gene *waxy*. A produção de novos transcritos Wx destes alelos é resultante de processamento alternativo, com a exclusão de exons próximos ao sítio de inserção do elemento (Varagona *et al.*, 1992). No caso do alelo *wx-G* foi verificada que a inserção de 5.6Kb do retrotransposon ocasionou a expressão tecido-específica do gene *waxy*, pois a atividade enzimática no pólen é 30 vezes maior do que no endosperma (Marillonnet & Wessler, 1997).

Um representante de uma grande família de pequenos elementos invertidos e repetidos, que também foi encontrada no gene *waxy* é o *Tourist*. A inserção deste elemento gerou o alelo *wx-B2* que é estável em vários 'background' genético de milho. Os estudos com este alelo indicaram que se a excisão deste elemento ocorre, ela deve ser muito rara (Bureau & Wessler, 1992).

Estes estudos têm demonstrado o quanto o gene *waxy* é frequentemente visitado por elementos de transposição. As contínuas avaliações deste loco podem levar à descrição de novos mecanismos intracelulares geradores de variabilidade genética, além de permitir um melhor entendimento molecular da ação dos elementos móveis no genoma.

3- Materiais e Métodos

3.1- Germoplasma

As linhagens de milho tropical utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas pelo Prof. Dr. William José da Silva e pertencem ao Banco de Germoplasma do Departamento de Genética e Evolução, IB, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As linhagens americanas utilizadas neste trabalho foram recebidas da Universidade Estadual da Carolina do Norte.

Linhagem Ast222

A linhagem Ast222 foi derivada de um cruzamento entre as linhagens Ast-o2 que possuía quatro gerações de endogamia e com a L222 que possuía mais de 10 gerações de endogamia, seguido de um retrocruzamento com o parental Ast-o2 [Ast-o2/BC1(Ast-o2xL222)]. Progênes deste retrocruzamento com a linhagem Ast-o2 segregaram para vários mutantes de endosperma com fenótipos semelhantes ao amylose-extender, sugary e etched, que ocorreram simultaneamente dentro de cada espiga. As duas linhagens parentais não segregavam para gene algum que alterasse a composição química e/ou textura do endosperma, com exceção do gene *opaco-2* (*o2*) que já existia em homozigose na linhagem Ast-o2.

Após a obtenção de progênes com vários mutantes de endosperma foi então desenvolvido um germoplasma mais apropriado para estudar a causa do aparecimento concomitante destes novos fenótipos. As progênes do retrocruzamento [Ast-o2/BC1(Ast-o2xL222)], foram autofecundadas por seis gerações sucessivas para a obtenção de uma linhagem pura, que deveria segregar apenas para o sistema de instabilidade genética. Esta linhagem, denominada Ast222, foi obtida através da seleção de progênes que apresentavam os vários mutantes de endosperma em gerações consecutivas de autofecundação. A linhagem Ast222 (S6) segregava para

os fenótipos de endosperma dos tipos normal, amylose-extender, sugary e etched. Nas progênies S7 foi, pela primeira vez, reconhecido o fenótipo waxy na linhagem Ast222. A realização de testes de alelismo com a linhagem Ast222 demonstrou a existência de mutação nos locos *waxy* (*wx*) e *amylose-extender* (*ae*). O fenótipo tipo sugary revelou-se resultante da ocorrência simultânea das mutações *wx* e *ae* no endosperma. Portanto, é possível que a mutação *wx* já estivesse presente em gerações anteriores, ocorrendo juntamente com o *ae* nas sementes enrugadas. Foi demonstrada uma contínua e simultânea ocorrência de instabilidade nos locos *waxy* e *amylose-extender* da linhagem Ast222 ao longo de quatro gerações (S7-S10) de autofecundação (Branquinho, 1993). Os diversos fenótipos de endosperma observados nas progênies segregantes da linhagem Ast222 estão representados na Figura 1.

No presente trabalho, foi utilizada a linhagem Ast222, a partir da geração S10, segregante para a mutação waxy em progênies de autofecundação e em progênies resultantes de cruzamentos com o parental L222 e Ast-o2. As progênies resultantes de autofecundação ou de cruzamentos foram avaliadas em nível molecular para identificar a causa da instabilidade genética do gene *waxy*. Para a análise molecular foram avaliadas aproximadamente 40 progênies de sublinhagens Ast222 autofecundadas e 25 progênies de cruzamentos.

Linhagens parentais Ast-o2 e L222

A linhagem L222 foi derivada da raça de milho Tuson e apresenta uma característica de incompatibilidade em cruzamentos quando é utilizada como fêmea. A linhagem Ast-o2 foi derivada de uma variedade sintética de milho denominada Asteca Prolífico, na qual havia sido incorporado o mutante de endosperma *opaco-2* (*o2*) por cruzamentos com germoplasma americano. Um mutante vivíparo com instabilidade genética

foi, na mesma época, encontrado em uma outra progênie desta mesma variedade Asteca Prolífico. As linhagens Ast-o2 e L222 são estáveis para características fenotípicas visuais de endosperma e plantas.

Linhagens controles

A linhagem L477 é derivada da variedade Asteca, raça Tuxpeño e possui mais de 10 gerações de autofecundação. Esta linhagem foi utilizada em cruzamentos com a linhagem Ast222 para avaliar o aparecimento de sementes com instabilidade somática. Foram avaliadas aproximadamente 180 progênies deste cruzamento. A linhagem L477 também foi usada como controle da amplificação de fragmentos waxy em experimentos de PCR.

A linhagem L902 é derivada da variedade São Simão, raça Cateto e possui mais de 10 gerações de autofecundação. Esta linhagem foi utilizada em experimentos de cruzamentos com a linhagem Ast222 para avaliar o aparecimento de sementes com instabilidade somática. Foram avaliadas aproximadamente 250 progênies deste cruzamento.

As linhagens americanas W23, W64 e B37 foram utilizadas como controle de amplificação de fragmentos waxy em experimentos de PCR. Estas linhagens também foram utilizadas em experimentos de Southern blot para obter um padrão de comparação no tamanho do fragmento waxy gerado pelo tratamento com endonucleases.

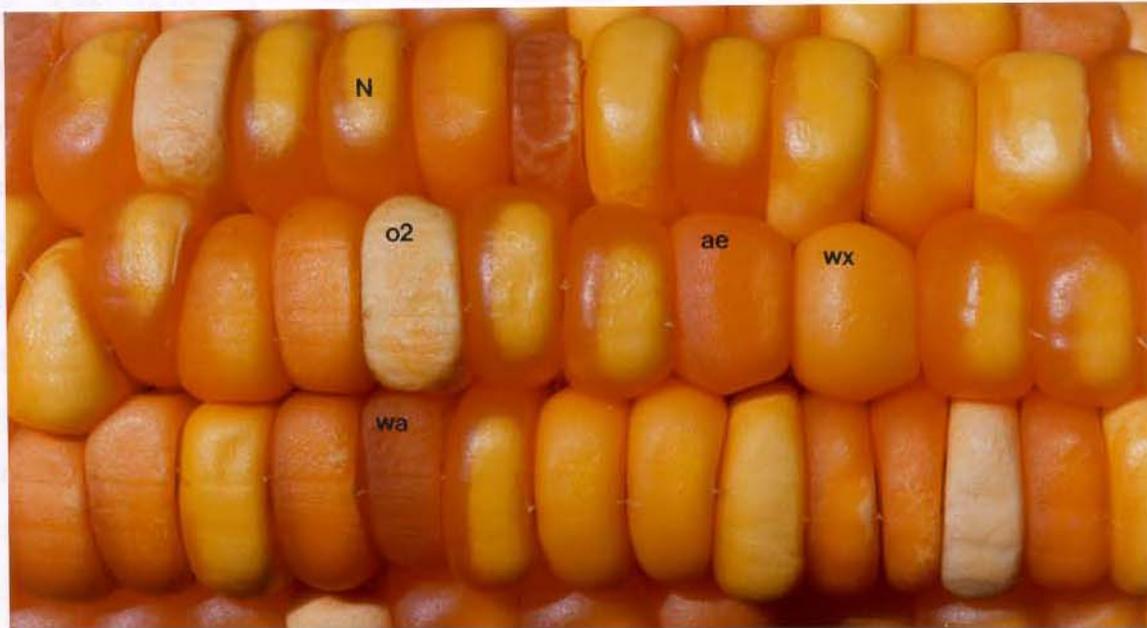


Figura 1- Classes fenotípicas observadas em uma progênie autofecundada da linhagem Ast222. Sementes com endosperma: Normal (N), waxy (wx), amylose-extender (ae), opaco-2 (o2) e duplo mutante wxwx/aeae (wa). (Reprodução a partir de Branquinho, 1993).

3.2- Experimentos de campo e análises fenotípicas de sementes

Os experimentos de campo foram realizados na área experimental do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP. Sementes dos genótipos em estudo foram plantadas em linhas de 10 m, cada uma com apenas um genótipo, contendo 50 plantas (2 plantas/cova). Foi adotado o procedimento de cultivo utilizado como rotina no Grupo de Pesquisa de Genética de Milho da UNICAMP.

Um plantio em campo isolado de aproximadamente 1.000 plantas Ast222 (S11) de genótipo *wxwxAe-* foi realizado visando estudar a frequência de reversão da mutação *waxy* para endosperma normal. Para este experimento, foi tomado o cuidado fundamental de se fazer o plantio em um campo isolado de outros campos de milho, para evitar contaminação com grãos de pólen desconhecidos no momento da fecundação. Somente nestas condições o experimento permitiria concluir que o surgimento de semente normal teria sido ocasionado por instabilidade genética. O isolamento do campo foi então feito mantendo-se uma distância acima de 200 m de outros campos de milho, além do isolamento simultâneo por época de florescimento.

Os padrões de segregação de sementes com endosperma normal ou mutante e a ocorrência da instabilidade somática foram estudados através de análises visuais das sementes. O método de coloração do amido do endosperma com solução de iodo, que permite distinguir os fenótipos *waxy* e normal (Schwartz & Echt, 1982), foi frequentemente utilizado nesta avaliação. O amido do endosperma normal da semente de milho consiste de aproximadamente 25% de amilose e 75% de amilopectina. A amilose adquire a coloração azul escuro, quando reage com iodo, enquanto que a amilopectina não reage com o iodo. Como no endosperma *waxy* o amido é constituído apenas de amilopectina, observa-se a coloração castanha em presença do iodo. A solução de iodo utilizada foi de 0.001N. Para o teste

com iodo, as sementes foram previamente lixadas para retirar o pericarpo e assim possibilitar uma melhor penetração do corante no endosperma.

3.3- Análise do padrão de restrição de fragmentos de DNA genômico

Para os experimentos de caracterização do padrão de restrição da linhagem Ast222 e linhagens controle, as sementes normais e mutantes foram plantadas em caixas individuais contendo vermiculita autoclavada e germinadas em câmara de ambiente controlado ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$, 14 h luz/10 h escuro). Cerca de 15-20 dias após o plantio, as folhas foram cortadas, embaladas em filme de PVC e em tela de nylon, imediatamente congeladas em N_2 líquido e armazenadas à -70°C .

Extração de DNA Genômico em gradiente de CsCl_2

Amostras de folhas congeladas foram maceradas na presença de N_2 líquido, em um almofariz esterilizado (200°C por 2 hs), evitando-se o descongelamento do tecido. Após a obtenção de um pó fino, o macerado foi colocado em um frasco contendo tampão de homogeneização (50mM Tris pH 8; 0,3M sacarose; 5mM MgCl_2). Este extrato foi homogeneizado com polytron e filtrado em 3 camadas de gaze. A seguir, o filtrado foi centrifugado à $350 \times g$ por 10 min, à 4°C (rotor Beckman JA-20), para sedimentação dos núcleos. O sedimento foi ressuspendido em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH8; 20mM EDTA) e foi adicionado Sarkosil à concentração final de 2%. O lisado foi incubado por 1 h em banho à 50°C . A seguir, foi adicionado 0,95g de CsCl_2 por ml do lisado. Proteínas insolúveis e polissacarídeos foram sedimentados à $17000 \times g$ (rotor Beckman JA 20), durante 15 min à 4°C . Brometo de etídio foi adicionado ao sobrenadante ($300\mu\text{g/ml}$). A concentração de CsCl_2 foi ajustada para o índice de refração de aproximadamente 1,3895. A suspensão foi centrifugada à 50000 rpm (rotor Beckman Ji-80) por 20 hs. A remoção da banda de DNA, fluorescente sob radiação UV, foi realizada com uma

seringa e agulha 30x12. O brometo de etídio foi removido com butanol-1. O DNA foi então, dialisado em TE, precipitado em 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 volumes de etanol gelado. Esta mistura foi mantida por 2hs à -20°C para precipitação do DNA. Após centrifugação, o DNA foi ressuspendido em tampão TE.

Extração de DNA Genômico com CTAB

Aproximadamente 2g de tecido foliar congelado em N₂ líquido foram macerados em almorafiz esterilizado (200° C por 2 hs), até obter um pó fino, sem permitir o descongelamento da amostra. Este pó foi colocado em tubo de polipropileno contendo 15ml de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M NaCl; 0,4 % β-ME; 20mM EDTA pH 8; 0,1M Tris pH 8; 1% Sarkosil). O tubo foi lentamente agitado por algumas vezes durante a incubação à 65°C por 30 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 10ml de SEVAG (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico) e, logo a seguir, o extrato foi centrifugado por 5 min à 8.740 x g (rotor Beckman JA 20). O sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo limpo. A seguir, adicionou-se um volume igual de isopropanol. O DNA foi sedimentado à 8740 x g (rotor Beckman JA 20) por 5 min, à temperatura ambiente. O sedimento foi seco ao ar livre e ressuspendido em 700µl de tampão 50 mM Tris pH8 e 10 mM EDTA, contendo 10µl de RNase (10 mg/ml). Após 1 h à temperatura ambiente, foi adicionado igual volume de fenol e SEVAG 1:1 (v:v). A mistura foi suavemente agitada, e em seguida, centrifugada por 3 min, à 12.000 rpm, em microcentrífuga. O sobrenadante foi removido com micropipetas utilizando-se ponteiras com pontas cortadas. Foram realizadas mais 2 extrações apenas com SEVAG. O DNA foi precipitado por adição de 75µl de 4M acetato de amônio (pH7) e 500µl de isopropanol. Após incubação durante a noite à -20°C ou à -80°C por 1 h, a suspensão foi centrifugada por 10 min, à 12.000 rpm, em

microcentrífuga. Descartou-se o sobrenadante, o DNA foi lavado 2 vezes com etanol 80% e depois de seco foi ressuspenso em TE.

Digestão do DNA genômico com endonucleases de restrição

Para a caracterização molecular da linhagem Ast222 e de seus parentais foram feitas digestões dos diversos genótipos com as enzimas de restrição *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *XhoI*, *SalI* e *PvuII*. Foram utilizadas 5 U de enzima para cada μg de DNA genômico e 10-15 μg de DNA para cada reação de restrição. A mistura de reação foi incubada à 37°C por um período de 12-16 horas. Em seguida, o DNA foi precipitado com 0.1 volume de 3M de acetato de sódio pH5.2 e 2.5 volumes de etanol gelado. Esta mistura foi mantida à -70°C por 30 min ou por 2hs à -20°C. Após este período, o tubo foi centrifugado por 10 min em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70%. Após os sedimentos estarem secos, o DNA foi ressuspenso em TE.

Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos obtidos pela digestão do DNA com enzimas de restrição foram separados em gel de agarose (0,6% ou 0,8%) em tampão 0,5X TBE (0,5M ácido bórico; 10mM Tris-base; 10mM EDTA), durante 12-16 horas à 30 volts.

Transferência neutra de DNA para membrana de nylon (Southern blot)

Após eletroforese, o gel de agarose foi imerso em solução 0,25N HCl por 30 min para depurinação. Todos os tratamentos do gel foram feitos sob suave agitação, à temperatura ambiente, e na troca de soluções o gel foi lavado em H₂O destilada e deionizada. A desnaturação foi feita com o gel imerso em solução 1,5M NaCl e 0,5M NaOH por 60 min. A neutralização foi realizada com dois períodos de incubação de 30 min na solução 1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl (pH 7,2); 1mM EDTA. O gel foi

invertido e colocado sobre um suporte coberto com papel 3MM cujas pontas estão imersas em solução de 10X SSC (3M NaCl; 0,3M citrato trisódico). A membrana de nylon (Nytran plus, S&S, 77419) umedecida em 2X SSC foi colocada em contato com o gel. A membrana de nylon foi então coberta com papel 3MM, sendo 2 folhas umedecidas nesta mesma solução e 2 outras secas. Logo acima foi montada uma coluna de 5-10 cm de papel toalha do mesmo tamanho do gel, que foi compactada com um peso de 500g. A transferência foi realizada durante 24-48 horas adicionando ao reservatório, sempre que necessário, a solução de transferência. A seguir, o sistema foi desmontado e a membrana lavada brevemente em 2X SSC. Depois de secar à temperatura ambiente, a membrana foi incubada entre papéis de filtro à 80°C durante 2 horas. Algumas vezes a membrana foi exposta à radiação ultravioleta em um equipamento 'crosslinker', em substituição ao tratamento por aquecimento.

3.4- Amplificação de sequências de DNA via PCR (Polimerase Chain Reaction)

A técnica de PCR foi utilizada com o objetivo de amplificar sequências parciais dos alelos *Wx* e *wx* da linhagem Ast222 e em linhagens controle.

Extração rápida de DNA para PCR

Sementes dos vários genótipos em estudo foram germinadas em copos plásticos contendo vermiculita. Após 15-20 dias, discos foliares foram coletados. Uma região da folha foi colocada entre a tampa e a abertura de um tubo de microcentrífuga. O tubo foi fechado diretamente sobre a folha. Os tubos de microcentrífuga contendo as amostras de discos foliares (2-3 discos) foram imediatamente imersos em N₂ líquido e armazenados à -70°C. Com o auxílio de um homogeneizador do tipo "kontes disposable pellet pestle", amostras de aproximadamente 10 mg de

folha foram homogeneizadas em 150µl de tampão de extração (KCl 50mM; Tris 10mM pH8; EDTA 5mM; Triton-X 1%; carborundum 1% w/v), no próprio tubo de microcentrífuga onde estavam armazenadas. Após a homogeneização, realizada dentro de poucos segundos, foram adicionados 150µl de uma mistura fenol/clorofórmio 1:1 (v:v). O extrato foi agitado em vortex por 2-3 minutos e centrifugado durante 10 min à aproximadamente 12.000 rpm. A seguir, 120µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Foram então adicionados 12µl de NaOAc e 105µl de isopropanol. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, o DNA foi sedimentado por centrifugação e ressuspendido em 30µl de tampão TE. Foram utilizados 2-4µl de cada amostra de DNA para amplificação de sequências do loco *waxy* em reações de PCR.

Primers e condições de amplificação de DNA

Os oligonucleotídeos utilizados como primers em reações de PCR para amplificação de sequências de DNA dos alelos *Wx* e *wx* estão apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2 estão descritas as condições de tempo e temperatura utilizadas nos ciclos de amplificação das sequências de DNA, com as diversas combinações de primers. Um conjunto de primers do gene da β-prolamina (gentilmente cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas -CBMEG) foi utilizado como controle da qualidade do DNA genômico na mistura de reação de PCR.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados como primers em reações de PCR para amplificação de sequências de DNA do loco *waxy* e do clone $\lambda wx-Ast222$. Os primers estão denominados de acordo com sua posição na sequência do gene *waxy* ou no clone $\lambda wx-Ast222$, referindo-se ao primeiro nucleotídeo 5' na fita de DNA.

Primer*	Posição no Gene	Sequência de Nucleotídeos
2100 (F)	Exon 5	5' ACGGACTACAGGGACAACCA 3'
2688 (F)	Exon 8	5' GTTCGCCTTCTCGACTACC 3'
3874 (R)	Exon 12	5' CGCTGAGGCGGCCCATGTGG 3'
4384 (R)	Exon 14	5' TGCACCACGCGCGAGATCAG 3'
4519 (R)	Exon 14	5' TAACTACACACGCAAGCAAT 3'
2160 (F)	Exon 6	5' TCAACAACAACCCATACTTCTC 3'
2395 (R)	2395(clone)	5' TAGAGAAAGTAGTAGTTCTTGGG 3'

* De acordo com a sequência *waxy* EMBL X 03935 e com a sequência do clone $\lambda wx-Ast222$.

F = Sequência de nucleotídeos 5'-3' (Forward), correspondente à sequência codificadora do gene.

R = Sequência de nucleotídeos 3'-5' (Reverse), correspondente à fita molde transcrita em mRNA.

Tabela 2. Condições de amplificação de sequências de DNA em reações de PCR com diversas combinações de primers.

Primers	Nº de Ciclos	Tempo e Temperatura em Cada Ciclo
2100/4519	35	1'30'' 94°C - 2' 55°C -3' 72°C
2688/3874 e 2688/4384	40	1' 95°C - 2' 65°C -2'30'' 72°C
2160/2395	1	5' 95°C
	2-30	1'30'' 95°C - 1'30'' 50°C -1'30'' 72°C

3.5- Análise de RNA

Extração de RNA

Aproximadamente 2g de tecido de endosperma imaturo, cerca de 20-22 dias após a polinização (DAP) foram macerados na presença de N₂ líquido em almofariz esterilizado, até obter um pó bem fino. Este pó foi colocado em um tubo de microcentrifuga, até a atingir a metade do tubo. A seguir, foram acrescentados 500µl do tampão de extração (42g/100ml urea; 0,35M NaCl; 20mM Tris-HCl pH7,5; 1mM EDTA pH 8; 2% Sarkosil). Imediatamente foram acrescentados 500µl de fenol:SEVAG e os tubos foram mantidos no gelo. As amostras foram misturadas com “pestle kontes” (Kontes, 749515) acoplado a um homogeneizador (Barnant Mixer) por aproximadamente 60 segundos e, em seguida, imersas em gelo. Os tubos foram centrifugados à 3.500 rpm, por 15 min à 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo gelado, um igual volume de fenol:SEVAG foi colocado na amostra e esta foi novamente centrifugada. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. As moléculas de RNA foram precipitadas com 3M NaOAc e etanol (0,1v:2,5v). Após agitação lenta, os tubos foram colocados à -20°C durante a noite. Toda a vidraria e demais materiais utilizados neste procedimento de extração de RNA foram tratados com 3% H₂O₂ por uma hora. Antes da autoclavagem, DEPC foi adicionado às soluções utilizadas na extração de RNA, em uma concentração final de 0,2%.

Eletroforese de RNA

O RNA foi separado através de eletroforese em gel de agarose (0.7%) com tampão 1X MOPS contendo 5% formaldeído. A cuba de eletroforese e a bandeja suporte do gel foram previamente tratadas com DEPC 0,2% durante 15 min. Na amostra de RNA a ser aplicada no gel foi adicionado 1µl de tampão consistindo de 10X MOPS, 50% formamida e 18% de

formaldeído. Um total de 2µl desta suspensão de RNA foi então misturada com 10µl do tampão de corrida e 3µl de bromofenol. Esta mistura foi desnaturada por 10min à 65°C e imediatamente imersa em gelo. A seguir, a amostra foi aplicada no gel de agarose e submetida à eletroforese.

Transferência de RNA para membrana de nylon (northern blot)

Após eletroforese, o gel de agarose foi lavado com água destilada esterilizada com DEPC e autoclavada. O gel foi então invertido e colocado sobre um suporte coberto com papel 3MM, cujas pontas estavam imersas em solução 10X SSC. A seguir, foi montado um sistema de northern blot, seguindo o mesmo esquema anteriormente descrito para Southern blot. A transferência do RNA para a membrana de nylon foi realizada durante 12 horas.

3.6- Clones utilizados para a preparação de sondas de hibridização

Sondas do gene waxy

Os clones das sequências de cDNA e DNA genômico do gene *waxy* utilizados para a preparação de sondas foram gentilmente cedidos por Susan Wessler (University of Georgia, USA). O clone pcDNA-*waxy* consiste de um fragmento de 2.3kb, correspondente à sequência completa do cDNA do gene *waxy*. Este fragmento está clonado no sítio *EcoRI* do vetor pGEM 4Z. A sequência do DNA genômico do gene *waxy* está contida em um fragmento de 10.8 kb que foi clonado no sítio *EcoRI* do vetor pBR, recebendo a denominação de pWx5. Células da linhagem de bactérias DH5α foram transformadas com esses dois clones *waxy*. Foram utilizadas 3 sondas do gene *waxy* marcadas com P³². A Sonda 1 foi gerada pela restrição do clone genômico de 10.8kb com as endonucleases *HindIII* e *EcoRV*. O tratamento com estas endonucleases gerou um fragmento de 3kb contendo a região promotora do gene e provavelmente parte da região

codificadora 5'. A Sonda 2 constituiu-se de um fragmento de 1.5kb, produto da amplificação do cDNA_{Wx} via PCR utilizando-se os primers 2100 e 4519 (Tabela 1). A terceira sonda, o cDNA_{Wx}, foi um fragmento de 2.3kb consistindo da sequência completa do cDNA do gene *waxy*. As posições das sondas 1 e 2 na sequência de DNA *waxy* estão apresentadas na Figura 2.

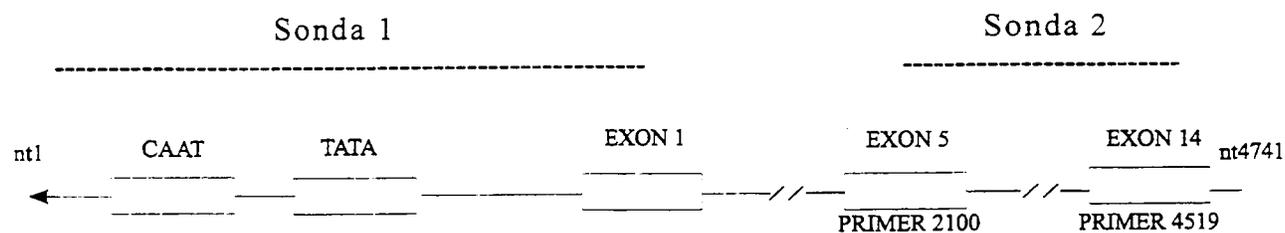


Figura 2- Representação do gene *waxy* indicando as posições da Sonda 1 (3kb) e Sonda 2 (1.5kb) utilizadas em hibridizações de Southern e northern blots.

Sondas do clone λ wx-Ast222

Para a caracterização de algumas sequências de DNA genômico foram utilizadas sondas produzidas a partir dos sub-clones Sal3 e Sal4 da linhagem Ast222. O sub-clone Sal3 foi tratado com as endonucleases *XbaI* e *Sall*. Esta restrição gerou fragmentos de 0.3, 0.6, 1.5 e 2.3kb. Os fragmentos de 0.6 e 2.3kb foram utilizados como sonda, que foram denominadas Sonda 600 e Sonda 2.3, respectivamente. O sub-clone Sal4 foi tratado com a endonuclease *Sall* e gerou um fragmento de 4kb, que foi utilizado como sonda. Esta sonda foi denominada Sonda S4.

Preparação de Escherichia coli competente para transformação

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH5 α foi transferida para meio líquido Luria-Bertani (LB) consistindo de 10g triptofano, 5g extrato de levedura e 10g NaCl. A suspensão de bactérias foi incubada à 37°C até atingir absorvância de 0,5-0,8 à 600nm. A cultura foi resfriada em gelo por 10 min e centrifugada à 7.740 x g por 10 min. O sedimento foi ressuscitado em 0,1M CaCl₂. A suspensão foi mantida no gelo por 20 min e novamente centrifugada nas mesmas condições. O sedimento foi então ressuscitado em 0,1M CaCl₂:glicerol (85:15). As células competentes foram aliqotadas (50 μ l) em tubos de microcentrífuga, imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas à -70°C.

Transformação

Amostra de 0.05-0.1 μ g de DNA dos clones foram adicionadas a células competentes (50 μ l) preparadas como descrito acima. Os tubos contendo a mistura DNA/bactérias foram mantidos no gelo por 15-30 min. A seguir, foram imediatamente transferidos para um banho à 42°C por 1 min e retornados para o gelo por 2 min. Após este choque térmico, foram adicionados 900ml de meio LB pré-aquecido (37°C). A cultura foi incubada por uma hora à 37°C e as células foram sedimentadas por

centrifugação à 6000 rpm por 2 min. O sedimento foi ressuscitado em 150µl do próprio meio e imediatamente uma alíquota foi plaqueada em meio LB contendo ampicilina (50mg/ml), X-Gal (20mg/ml) e IPTG (24mg/ml), para selecionar as células transformadas.

Isolamento de plasmídios em pequena escala (mini-prep)

Esta metodologia foi basicamente aplicada para confirmar eventos de clonagem e transformação. Colônias individuais de bactérias provenientes de experimentos de transformação crescidas em placas de Petri sobre meio LB contendo ampicilina (50mg/ml) foram selecionadas. As amostras destas colônias de bactérias foram utilizadas para inocular 2,5ml de meio LB líquido, contendo ampicilina (50mg/ml). As culturas foram incubadas à 37°C sob agitação constante (200 rpm) durante a noite. Transferiu-se 1,5ml da cultura de bactérias para um tubo de microcentrífuga, que foi centrifugado por 2min à 13.000 rpm. O sedimento foi ressuscitado em 100µl de solução 1 (25mM Tris-HCl pH 7,4; 10mM EDTA pH 8; 50mM glicose). Logo em seguida, acrescentou-se 200µl de uma solução 0,2M NaOH e 1%SDS. Esta mistura foi lentamente agitada por inversão durante 15 segundos e então foram adicionados 150µl de solução 3M acetato de potássio, pH 4,8. Após agitação por inversão até obter uma solução homogênea, o tubo foi centrifugado por 10 min. Os 400µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga onde foram adicionados 720µl de etanol (100%) gelado. O DNA foi precipitado à -20°C por 10 min e em seguida foi centrifugado por 10 min em microcentrífuga à 12.000 rpm. O sedimento foi lavado com etanol (70%) gelado, deixando-se secar à temperatura ambiente, e então foi ressuscitado em tampão TE contendo RNase (10 mg/ml).

Isolamento de plasmídios em larga escala

A linhagem DH5 α de *E. coli* contendo o clone desejado foi cultivada em 500 ml de meio LB contendo ampicilina (50 mg/ml), por toda a noite. A cultura foi centrifugada a 7.520 x g em rotor Beckman JA-14, durante 10 min à 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em solução 1 (25mM Tris-HCl pH 8; 50mM glicose; 10mM EDTA). Logo a seguir, adicionou-se lisozima (25mg/ml) à solução 1. Depois de bem misturado, o lisado foi mantido à temperatura ambiente por 10 min. Acrescentou-se então a solução 2 (0,2N NaOH; 1% SDS). Os tubos foram mantidos no gelo por 10 min e suavemente agitados. Acrescentou-se 3M acetato de potássio e o lisado foi então centrifugado à 17.400 x g (rotor Beckman JA-20) por 20 min à 4°C. Ao sobrenadante adicionou-se igual volume de fenol:SEVAG. Após misturar bem a suspensão, esta foi centrifugada por 10 min à 3.030 x g. As impurezas, bem como os traços de fenol, foram retiradas repetindo-se a extração com SEVAG por mais duas vezes. O DNA foi precipitado por adição de 0,6 volumes de isopropanol e incubado à -20°C por 2 hs. Os tubos foram centrifugados por 10 min à 17.400 x g. O sedimento foi lavado com etanol (70%), deixando-se secar à temperatura ambiente. A seguir, o DNA foi ressuspensionado em tampão TE contendo RNase (10 mg/ml).

Isolamento de inserto

Após o tratamento com a enzima de restrição apropriada, a sequência de DNA desejada foi separada do vetor através de eletroforese. Os seguintes métodos foram utilizados para retirar o inserto do gel de agarose:

Isolamento por centrifugação

Após a digestão com a enzima de restrição apropriada, a amostra de DNA plasmidial foi submetida a eletroforese em gel de agarose (0,6-1%).

A banda de interesse foi cortada e o pedaço de agarose contendo o DNA foi retirado do gel. Em um tubo de microcentrífuga (0.5ml), com a base furada e sem a tampa, foi colocado um pouco de lã de vidro siliconizada (3mm), que foi compactada no fundo no tubo. Este tubo foi então encaixado dentro de um outro tubo de microcentrífuga (1.5ml) intacto. O pedaço de agarose contendo o fragmento de DNA desejado foi colocado sobre a lã de vidro siliconizada e mantido à -20°C por 15 min. Decorrido este período, os tubos foram centrifugados à 6.000 rpm por 10 min. O DNA, filtrado juntamente com o tampão do gel, foi então precipitado com dois volumes de 100% etanol e 0.1 volume de 3M de acetato de sódio pH 4.8, à -20°C por 15 min. O DNA foi sedimentado por centrifugação à aproximadamente 12.000 rpm por 15 min e ressuspendido em tampão TE.

Isolamento com kit QIAEX II

Após eletroforese, o pedaço de agarose contendo o DNA de interesse foi colocado dentro de um tubo de microcentrífuga e submetido à metodologia de purificação de DNA recomendado para o kit QIAEX II (QIAGEN, 20021). Este método consiste basicamente em adsorver o DNA em partículas de uma resina de sílica gel em presença de sais, seguindo-se de lavagem e eluição com tampões apropriados.

Marcação radioativa da sonda

O fragmento de DNA obtido utilizando-se um dos métodos acima descritos, foi marcado com P³². Para a incorporação do radioisótopo foram utilizadas duas metodologias. Em uma delas, a sonda foi marcada pelo método de *random primer labelling* utilizando-se o kit *Mega-Primer-Labelling Systems* (Amersham, RPN 1604). Este método consiste basicamente do pareamento de primers ao acaso na molécula de DNA desnaturada, seguindo-se pela síntese de DNA pela polimerase Klenow para a incorporação de nucleotídeos marcados com o radioisótopo. As

reações e os procedimentos destas marcações seguiram as recomendações do fabricante.

O segundo método, consistiu da marcação através de amplificação do DNA via PCR em presença de um dos dNTPs marcado com o radioisótopo P^{32} . Os primers utilizados nas reações de PCR estão posicionados nos nucleotídeos 2100 e 4519 da sequência waxy, como apresentado na Tabela 1. A mistura de reação do PCR consistiu de 5U de Taq-Polymerase, tampão para a enzima, aproximadamente 7,5ng do DNA, 2 mM de cada dNTP, com exceção daquele utilizado também como radioisótopo. O α - P^{32} dNTP foi utilizado na concentração de 50 μ Ci, juntamente com 0,036mM do mesmo dNTP. A sequência de DNA (1.5kb) foi amplificada em 40 ciclos de 1' 30'' à 94°C, 2' à 55°C e 3' à 72°C.

A atividade específica da sonda foi determinada em uma alíquota da reação de marcação colocada em papel DE-81. O papel contendo uma alíquota da sonda foi lavado 3 vezes, por 2 min cada vez, em solução 0.5M Na_2HPO_4 . Em seguida, foi lavado 2 vezes, por 1 min, em H_2O deionizada. Este procedimento de lavagem do filtro DE-81 foi realizado para remover os nucleotídeos não-incorporados ao DNA. A seguir, o papel foi mergulhado por poucos segundos em etanol. Após a secagem do papel, foi determinada a contagem da radioatividade incorporada no DNA utilizando-se o cintilômetro 1217 rackbeta (LKB Wallac). O cálculo para estimar a atividade específica foi feito utilizando-se a seguinte fórmula (Manual de Biologia Molecular - CBMEG)

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{cpm} \times \text{volume de marcação } (\mu\text{l})}{\text{volume da alíquota } (\mu\text{l}) \times \text{quantidade de DNA(ng)}}$$

Foram utilizadas sondas com atividade específica entre 10^8 - 10^9 cpm/ μ g DNA. Antes da reação de hibridização, os nucleotídeos não

incorporados à sonda radioativa foram eliminados em coluna de resina Sephadex G50 eluída com tampão TE.

3.7- Hibridização de membranas

A membrana de nylon contendo o DNA foi incubada em solução de pré-hibridização (5X SSC; 50mM Tris-HCl; 1% SDS; 10X Denhardt's; 50% formamida; 100µg/ml de DNA de esperma de salmão) por 4-6 horas, à 42°C. Decorrido este período, esta solução foi substituída pela solução de hibridização (5X SSC; 0,02M Tris-HCl; 1% SDS; 2X Denhardt's; 50% Formamida; 100µg/ml de DNA de esperma de salmão; 10% sulfato de dextran), contendo a sonda já desnaturada. A incubação prosseguiu por mais 12 horas.

Lavagem da Membrana e Exposição

Após a hibridização, o excesso de radioatividade da membrana foi removido por subsequentes lavagens de imersão, sob leve agitação. A primeira lavagem foi com 2X SSC e 0,5% SDS por 5 min, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada com solução 2X SSC e 0,1% SDS por 15 min, à temperatura ambiente. As próximas duas lavagens foram feitas à 60°C, com solução de 0,1X SSC e 0,1% SDS, por 20 min cada uma. Após cada lavagem, a radioatividade da membrana foi avaliada com contador Geiger para estimar a necessidade ou não de lavagens subsequentes. Quando a contagem era alta, todas as lavagens eram realizadas. Quando a contagem era baixa, o tempo de cada lavagem foi reduzido ou até mesmo eliminado. Finalmente, foi feita uma breve lavagem em 1X SSC. A seguir, a membrana foi envolta, ainda úmida, em um filme de PVC e exposta a um filme de RaioX (Hyperfilme-Amersham, RPN 1675). A exposição foi feita em cassete de autorradiografia com placas intensificadoras, em freezer -70°C, por 1-10 dias. O filme foi revelado

utilizando-se revelador e fixador Kodak, nos seguintes tempos: revelador = 3 min; água = segundos; fixador = 2 min; água corrente = 1-2 min.

Reutilização da Membrana

Quando houve interesse em reutilizar a membrana, esta foi mantida úmida e protegida pelo filme PVC, evitando-se que secasse. A membrana foi tratada com 0,4M NaOH por 30 min, à 45°C, sob agitação. Descartada esta solução, a membrana foi imersa em solução contendo 0,1X SSC; 0,1% SDS; 0,2M Tris-HCl pH7,5, e novamente incubada à 45° C sob leve agitação, por 30 min. A seguir, a membrana foi lavada brevemente em 0,1X SSC.

3.8.- Construção do banco de DNA genômico

Uma progênie (S12) da linhagem Ast222, denominada Ast222wx-P147 homozigota e estável para o endosperma mutante *waxy*, foi escolhida para construir um banco genômico. O objetivo deste experimento foi clonar a sequência *waxy* mutante para tentar identificar o mecanismo genético envolvido com a instabilidade deste loco na linhagem Ast222. O critério para a escolha desta progênie foi definido com base em um experimento prévio, no qual foi observada uma alta frequência de instabilidade somática do gene *waxy* nos descendentes F₁ do cruzamento Ast222wx-P147 x L222.

Sementes Ast222wx-P147 foram coletadas do campo cerca de 20-22 DAP. As sementes foram removidas das espigas e o endosperma foi separado do embrião. As amostras de endosperma foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas à -70°C, para posterior extração de DNA.

Extração de DNA

As amostras de endosperma congeladas em N₂ líquido foram maceradas até obter um pó fino, sem permitir o descongelamento da amostra. Este pó foi colocado em um tubo de polipropileno contendo 15 ml do tampão de extração (2% CTAB; 1,4M NaCl; 0,4% β-ME; 20mM EDTA pH 8; 0,1M Tris pH 8; 1% Sarkosil). O tampão foi misturado com o tecido macerado por sucessivas inversões lentas do tubo. O extrato foi incubado à 65°C por 30 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 10ml de SEVAG e, logo a seguir, a solução foi centrifugada por 5 min a 8.740 x g (rotor Beckman JA 20), à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco ao ar livre e ressuscitado em 4ml de tampão (50mM Tris pH8; 10mM EDTA). Após a ressuspensão, foram adicionados 0,95g de CsCl₂ por ml do lisado e Brometo de etídeo (300µg/ml). A suspensão teve a concentração de CsCl₂ ajustada para o índice de refração de aproximadamente 1,3895. A suspensão foi então centrifugada à 50.000 rpm por 20hs. A remoção da banda fluorescente foi realizada sob radiação UV com seringa e agulha 30x12. O brometo de etídeo foi removido por sucessivas extrações com butanol-1 equilibrado com H₂O. O DNA foi dialisado em tampão TE, precipitado em 3M acetato de sódio (pH5,2) e etanol gelado 0,1:2 (v/v) e depois ressuscitado em tampãoTE.

Cinética enzimática do DNA

O DNA genômico da progênie Ast222wx-P147, extraído e purificado conforme descrito acima, foi digerido com a enzima *MboI*, que possui extremidades compatíveis com os braços do vetor λDashII/*BamHI*. Um primeiro experimento teve o objetivo de estabelecer um tempo ideal de reação de restrição para obter fragmentos de DNA genômico variando entre 10-23kb. Aproximadamente 25µg de DNA foram adicionados a um tubo de

microcentrífuga contendo a mistura de reação de restrição, consistindo de tampão da enzima e 0,1M espermidina. A amostra foi incubada em banho à 37°C por 5 min. A seguir, 2U da enzima *MboI* foram adicionadas à mistura de reação. Imediatamente foi transferida uma alíquota de 10µl da mistura de reação para um novo tubo contendo 6µl de 0.25M EDTA. Este procedimento foi repetido nos intervalos de 5, 7,5, 10 e 15 min para verificar o tempo ideal de digestão parcial. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (0,5%). O tempo selecionado para a restrição do DNA no experimento de construção do banco genômico foi de 7,5 min, quando foi observada a maior concentração de fragmentos de DNA na faixa de 10-20kb. Aproximadamente 250µg de DNA total foram parcialmente digeridos com 20U da enzima *MboI* durante 7,5 min à 37°C. Após a digestão, a enzima foi inativada por tratamento à 70°C durante 5 min. O DNA foi precipitado com 3M acetato de sódio e etanol por 2 hs à 20°C. Após a ressuspensão do DNA em tampão TE, a amostra foi aplicada em um gradiente de sacarose.

Separação dos fragmentos de DNA por gradiente de sacarose

O gradiente de sacarose foi preparado utilizando-se soluções 5% e 40% de sacarose anidra (Sigma, S0389) em tampão TEN (1M NaCl; 10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA). As soluções de 5% e 40% sacarose foram colocadas nos tubos de um aparelho formador de gradiente manual. A este aparelho de gradiente foi acoplada uma bomba peristáltica (Incibrás BP 100) com o fluxo de 25ml/min. No canal que separa os dois tubos do formador de gradiente foi primeiramente colocada a solução 5% sacarose e, a seguir, foi adicionado igual volume de sacarose 40%. A bomba e a trava do formador de gradiente foram abertos simultaneamente e o gradiente de sacarose consistindo de 12ml foi recolhido em tubos de polyallomer (14x89mm) para ultracentrífuga (Beckman, rotor SW41). As amostras de DNA parcialmente digeridas foram então colocadas sobre o

gradiente de sacarose e centrifugadas à 30.000 rpm, à 4°C por 16hs (rotor Beckman SW 41). A aceleração utilizada foi de uma unidade e a desaceleração foi zero. Após 16hs, foram recolhidas 28 alíquotas de 400µl, que foram numeradas de acordo com a sequência em que foram amostradas. Foi retirada uma amostra de 10µl de cada alíquota de números 8-20 para eletroforese em gel de agarose, com o objetivo de verificar quais delas continham os fragmentos de DNA variando entre 10-20 kb, a serem utilizados para a clonagem em vetor λ DashII/*Bam HI*. Após a migração em gel de agarose (0,5%), foram selecionadas 3 alíquotas que possuíam fragmentos de 10 a 20Kb. Estas 3 alíquotas de 390µl selecionadas foram colocadas juntas em um mesmo tubo de ultracentrífuga. A este tubo foi adicionado 1,8ml de água, purificada em aparelho 'Milli-Q' e autoclavada, e 7,5ml de etanol gelado. As amostras foram mantidas à -20°C para precipitação do DNA durante toda a noite. A amostra de DNA foi centrifugada à 30.000 rpm, à 4°C por 1 h. O DNA foi ressuscitado em 300µl de tampão TE e transferido para um tubo de microcentrífuga. Uma nova precipitação da amostra de DNA foi realizada com 0,1 volume de 3M acetato de sódio pH5,2 e 2 volumes de etanol gelado. O tubo de microcentrífuga contendo a suspensão de DNA foi mantido à -20°C por toda a noite. A seguir, os tubos foram centrifugados por 30min em microcentrífuga à 12.000rpm. O DNA foi seco à temperatura ambiente, e então ressuscitado em 20µl de tampão TE.

Ligação dos fragmentos de DNA de milho ao DNA do fago

O vetor escolhido para clonagem do DNA genômico da linhagem Ast222wx foi o bacteriófago λ DashII/*BamHI* (Stratagene, 247211), capaz de se ligar a fragmentos de DNA entre 9 e 23 Kb. A enzima *MboI* utilizada para a digestão do DNA genômico gera fragmentos com extremidades complementares às extremidades do DNA desse vetor, que estava previamente digerido com a enzima *BamHI*. Os fragmentos de DNA

genômico, assim obtidos, foram ligados aos braços do fago λ DashII. Para a reação de ligação foi utilizado o kit de ligação da Stratagene (203003), que consiste de 4U/ μ l da enzima ligase, tampão da enzima e ATP, seguindo-se as instruções do fabricante. A mistura de ligação foi deixada por toda a noite à 14°C e, em seguida, foi colocada na geladeira por 24hs para aumentar a possibilidade de formação de concatâmeros de DNA e facilitar o empacotamento.

Empacotamento do fago e multiplicação em bactéria

Após as 24 horas de incubação na geladeira, a mistura de ligação foi empacotada com o kit GoldIII (Stratagene, 200202) seguindo-se as instruções do fabricante. O DNA λ DashII/*Bam*HI, previamente submetido à reação de ligação com o DNA do milho, foi misturado com o extrato de empacotamento do kit GoldIII. Os bacteriófagos recombinantes foram multiplicados na linhagem de bactéria XL1-Blue MRA(P2) fornecida com o kit. Inicialmente, uma colônia isolada da bactéria XL1-Blue MRA(P2) foi inoculada em meio de cultura LBM (meio LB contendo 10mM MgSO₄), suplementado com 0,2% maltose (v/v). A suspensão de bactérias foi incubada à 37°C, sob agitação (200 rpm), durante 4-6hs, até atingir DO_{600nm} não superior a 1. A cultura foi centrifugada à 2.000 rpm por 10min. As células foram gentilmente ressuspendidas em 10mM MgSO₄, em um volume apropriado para atingir DO_{600nm} igual a 0,5.

Dos 500 μ l da reação de empacotamento foi retirado 1 μ l para infecção de 200 μ l de suspensão de célula hospedeira, para determinação do título do banco. O fago e a bactéria foram incubados juntos, por 15 min à 37°C, para permitir a adesão do fago às células. À esta mistura fago/bactéria foram adicionados 4ml de top-agarose (0,7% agarose e 10mM MgSO₄), pré-aquecido à 55°C, que imediatamente foi vertido em placa de petri com

meio LB. As placas de petri foram mantidas por toda a noite à 37°C. As placas de lise foram observadas após 12hs.

Seleção de clones

A seleção dos clones recombinantes da sequência do gene *waxy* foi realizada em placas de Petri (150mm x 20mm) contendo em média 40.000 fagos por placa. As bactérias com os fagos foram incubadas por 8-12hs à 37°C. As placas de lise foram crescidas até atingir 1-2mm de diâmetro. As placas de Petri contendo bactérias lisadas foram incubadas à 4°C por um período de no mínimo 2 horas. A seguir, um filtro de nylon (Amersham, RPN137N) foi colocado sobre a cultura bactéria/fago para transferência das placas de lise. Estes filtros contendo os fagos recombinantes foram então desnaturados com 1,5M NaCl e 0,5M NaOH, neutralizados com 1,5M NaCl e 0,5M Tris pH8 e lavados com 2X SSC, seguindo-se as instruções da Stratagene. O DNA foi ligado aos filtros de nylon utilizando-se equipamento UV Stratalinker (Stratagene) ajustado no modo autocrosslink. As membranas foram pré-hibridizadas e hibridizadas com a solução de 6X SSC; 0.1% de N-laurilsarcosinato de sódio; 0.2% SDS; 0.05X BLOTTO (5% de leite em pó desnatado Molico); 50% de formamida. A sonda utilizada nas hibridizações foi o inserto de cDNAWx com uma atividade específica de 2.5×10^8 cpm/ μ g de DNA. As membranas foram pré-hibridizadas durante 2 a 4hs. A seguir, a solução de pré-hibridização foi descartada e as membranas foram colocadas na solução de hibridização contendo a sonda. A hibridização ocorreu à 42°C por toda a noite. A lavagem das membranas foi feita com solução 2X SSC; 0,1%SDS, à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, as membranas foram lavadas à 60°C por 10 min, com a solução 0,1XSSC; 0,1%SDS. As membranas foram protegidas com filme PVC e foram expostas ao filme de autorradiografia durante 5 dias. Após a revelação dos autorradiogramas, os filtros foram orientados e alinhados nas placas de Petri contendo as placas

de lise, para retirada dos clones putativos. Os clones foram retirados com ponteiros de micropipeta (p1.000) com a ponta cortada e colocados em tubos de microcentrífugas contendo 500µl de tampão SM (100mM NaCl; 50mM Tris pH 7,5; 10mM MgSO₄) e 10µl de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vortex e deixados à 4^oC por uma noite. Foram realizadas três etapas de seleção do banco genômico. Para a primeira seleção foram analisadas aproximadamente 1.2x10⁶ pfu. O DNA dos bacteriófagos recombinantes com sequências homólogas ao gene *waxy* foram selecionados e purificados.

Preparação do bacteriófago

Uma colônia de bactéria hospedeira, *E. coli* MRA, foi utilizada para inocular 20ml de meio LBM contido em um erlenmeyer. A suspensão foi incubada para crescimento à 37^oC por toda a noite com agitação à 300 rpm. A DO_{600nm} da cultura foi então avaliada para o cálculo do título das células. Sabe-se que DO_{600nm} igual à 1 corresponde à 8x10⁸ células/ml. Uma alíquota da cultura contendo 10¹⁰ células foi transferida para um tubo de centrífuga esterilizado, e centrifugada à 4000 x g por 10min. O sedimento foi ressuspensionado em 3ml de solução SM. A esta suspensão de células foi adicionado o fago selecionado em uma concentração de 5x10⁷ pfu. Para permitir a infecção das bactérias pelos fagos recombinantes, a mistura foi incubada à 37^oC por 20min, sob leve agitação. Uma alíquota de 300µl de células infectadas foi transferida para 50ml de meio LBM. A cultura foi incubada à 37^oC com agitação à 300rpm. Neste período ocorreu crescimento simultâneo da bactéria e do fago, que resultou em uma lise da cultura após aproximadamente 6hs. A lise foi monitorada a partir de 4hs de cultivo, efetuando-se sucessivas leituras espectrofotométricas à DO_{600nm}. A queda da DO_{600nm} indicou o decréscimo do número de bactérias e, conseqüentemente, indicou o momento da lise. Após a cultura ter atingido a lise desejada, foi adicionado 1ml de clorofórmio. A cultura foi

novamente deixada à 37°C, por 10 min, sob agitação vigorosa (300 rpm), e imediatamente foi colocada em gelo, onde foi mantida por 10 min. A cultura foi então transferida para tubos de centrifuga (Beckman JA-10), com o cuidado de não transferir o clorofórmio. A centrifugação foi realizada à 7000 rpm, à 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o DNA foi então purificado utilizando-se o kit Lambda Midi kit (QIAGEN, 12543).

Avaliação de clones recombinantes

A avaliação dos clones recombinantes iniciou-se com a digestão do DNA com as endonucleases de restrição *EcoRI*, *XbaI*, *Sall* e *NotI* seguida pela migração em gel de agarose 0.5% para posterior avaliação por Southern blot. O gel foi colocado em solução de depuração de 0.25N HCl, por 15min, com agitação suave. Logo em seguida, o gel foi lavado com H₂O, e submergido em solução de desnaturação 1.5M NaCl e 0.5M NaOH. O tampão de desnaturação foi substituído pelo tampão de transferência alcalina (0.25M NaOH e 1.5M NaCl). A seguir, foi montado um sistema de transferência de Southern blot, como descrito anteriormente, com uma única modificação no método, que foi a utilização de tampão de transferência alcalino. A transferência do DNA para a membrana de nylon (Nytran plus, S&S, 77419) ocorreu por 12hs. A membrana foi rapidamente lavada com 2X SSC. Depois de secar à temperatura ambiente, a membrana contendo o DNA foi exposta à radiação ultravioleta, utilizando-se o ajuste autocrosslink do equipamento UV Stratalinker (Stratagene). A membrana foi então submetida à reação de hibridização do DNA com a sonda de cDNA_{wx} marcada com P³². O clone selecionado, consistindo do fragmento de DNA genômico de milho da linhagem Ast222, contendo a sequência waxy clonada no bacteriófago λDashII foi denominado λ_{wx}-Ast222.

Sub-clonagem do clone genômico λ wx-Ast222

O clone λ wx-Ast222, consistindo de aproximadamente 11.3kb, foi sub-clonado em vetores apropriados para permitir o sequenciamento dos nucleotídeos. O tratamento do clone λ wx-Ast222 com a endonuclease *Sall* gerou 3 fragmentos de 4.5kb, 3kb e 3.8kb. Os vetores Bluescript KS e pGEM 3Z foram utilizados para a sub-clonagem desses fragmentos, gerando os clones Sal2 (inserto -3kb), Sal3 (inserto -4.5kb) e Sal4 (inserto -3.8kb). A clonagem nos vetores foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989). Transformação de bactérias e purificação de plasmídios foram realizadas de acordo com os procedimentos anteriormente descritos.

Sequenciamento de nucleotídeos dos sub- clones do DNA genômico

Todos os sub- clones resultantes da digestão do clone de DNA genômico λ wx-Ast222 foram submetidos a reações de sequenciamento de nucleotídeos. Foram utilizados os métodos de sequenciamento automático e sequenciamento manual. O sequenciamento utilizado seguiu o método de dideoxy e foi realizado em parte no CBMEG-UNICAMP e em parte no Laboratório Nucleic Acid and Protein Service unit of University of British Columbia, Canadá. O sequenciamento manual de nucleotídeos de DNA foi especificamente empregado para sequências do clone λ wx-Ast222 contendo regiões ricas em citosina e guanina. Estas regiões comumente resultam em pareamento no DNA fita simples com a formação de *hairpins*, que por sua vez impossibilitam a ação da DNA polimerase para a incorporação de nucleotídeos. O sequenciamento manual dessas regiões do DNA ricas em G-C parecem requerer uma habilidade técnica um tanto especializada e, por isso, essas regiões foram sequenciadas pela BioStrand, Trieste, Itália, que é uma firma especializada neste tipo de sequenciamento.

Amplificação via PCR de uma sequência de DNA de interesse em genótipos de milho

Com base no conhecimento adquirido sobre a sequência de nucleotídeos do clone *λwx-Ast222*, uma região de interesse foi escolhida para estudos adicionais de amplificação de DNA via PCR, utilizando os primers 2160 e 2395 (Tabela 1). Amostras de DNA do clone *λwx-Ast222*, da progênie Ast222-P147 utilizada na construção do banco genômico e do híbrido instável F₁(Ast222wx x L222) e de algumas linhagens de milho com endosperma normal (L222, Ast-o2 e W64) foram utilizadas em reações de PCR. O DNA foi utilizado sem tratamento com enzimas de restrição e também tratado com as endonucleases *PstI* e *XbaI* ou *PstI* e *HindIII*. As reações de restrição do DNA foram realizadas de acordo com a metodologia anteriormente descrita. As condições de amplificação via PCR utilizando-se esses primers estão descritas na Tabela 2.

4- Resultados

4.1- Análises genéticas da instabilidade do loco *waxy*

Os resultados das análises fenotípicas de segregação de sementes em progênes da linhagem Ast222 nas geração S7-S10 (Branquinho, 1993) e nas progênes estudadas no presente trabalho (S10-S12) revelaram instabilidade somática para os mutantes de endosperma *waxy* e *amylose-extender*. Foram também observados desvios de segregação nas progênes das gerações S7-S10, indicando a ocorrência de instabilidade germinal. A instabilidade somática caracterizou-se por setores *waxy* ou *amylose-extender* de diversos tamanhos no endosperma normal, ao longo das gerações de autofecundação. Foram também observados setores enrugados em endosperma *waxy*, que são resultantes da instabilidade somática associada ao genótipo *wxwx/Aeae*. Em aproximadamente 150 progênes instáveis da linhagem Ast222, foi possível observar que a instabilidade genética gerou mutações no endosperma apenas no sentido normal para mutante *waxy* ou *amylose-extender*.

As avaliações dos fenótipos das sementes das progênes Ast222 (S10-S12) utilizadas no presente trabalho revelaram baixa frequência de instabilidade nos locos *waxy* e *amylose-extender*. Nessas gerações altamente endogâmicas, geralmente eram encontradas apenas 1-2 sementes com instabilidade somática, ocorrendo em poucas espigas das numerosas progênes de plantas autofecundadas. A ocorrência de frequências baixas de instabilidade nas gerações avançadas de autofecundação foi confirmada em uma avaliação da geração S12 da linhagem Ast222. De 400 progênes (*Wx-Ae-*) autofecundadas, apenas 13 progênes apresentaram instabilidade somática para os fenótipos *waxy* ou *amylose-extender*, ocorrendo em apenas 1-2 sementes por espiga.

Considerando-se a importância da associação dos estudos moleculares com a expressão fenotípica da instabilidade genética em

estudo, foi planejado um experimento com o objetivo de derivar progênies com maior atividade de instabilidade do loco *waxy*. Assim, poder-se-ia escolher uma sublinhagem Ast222wx diretamente associada com a capacidade de gerar instabilidade no gene *waxy*, para então construir um banco genômico e clonar o alelo mutante *waxy* da linhagem Ast222. Este experimento foi planejado com base na hipótese mais provável de que a instabilidade da linhagem Ast222 poderia ser causada por um elemento de transposição. Progênies da linhagem Ast222wx (S12), homozigotas *waxy* estáveis *wxwxAeAe*, foram cruzadas com os parentais L222 e Ast-o2 e com as linhagens L902 e L477. Paralelamente, também foram realizados cruzamentos da linhagem Ast222 (*Wxwx/Ae-* e *WxWx/Ae-*) com os parentais L222 e Ast-o2. Os descendentes F₁ desses cruzamentos foram avaliados para a ocorrência de instabilidade somática no loco *waxy*. Os dados do número de progênies que apresentaram instabilidade somática estão apresentados na Tabela 3.

Nas sementes F₁ de duas espigas resultantes do cruzamento Ast222-*wxwxAeAe* x L222, foram observadas as mais altas frequências de instabilidade somática, caracterizada por setores *waxy* em endosperma normal. Cerca de 90% das sementes em cada espiga eram instáveis para o loco *waxy*. Esta alta frequência de instabilidade somática foi contrastante com os resultados obtidos para as progênies F₁ resultantes dos outros cruzamentos. O resultado de alta instabilidade nestes cruzamentos restringiu-se a uma progênie Ast222 da família 5.8. Esta progênie foi então escolhida para a continuidade dos estudos e foi denominada Ast222wx-P147. Cruzamentos de progênies-irmãs (Ast222wxwx), derivadas de outras sublinhagens, mostraram baixa frequência de instabilidade, 1-2 sementes por espiga nos descendentes F₁. Resultado semelhante foi obtido para os cruzamentos envolvendo as linhagens L902 e L477.

Plantas derivadas das sementes instáveis das progênies F_1 (Ast222wx-P147 x L222) foram autofecundadas. A geração F_2 resultante desta autofecundação segregou para sementes normais e mutante waxy. As espigas F_2 (Ast222wx-P147 x L222) foram analisadas quanto à frequência de sementes normais, sementes normais com setores waxy e sementes totalmente waxy. As frequências de fenótipo normal (N) e mutante (wx) foram avaliadas pelo teste de X^2 , de acordo com a hipótese de segregação monofatorial de 3N:1wx. Como apresentado na Tabela 4, em 17 espigas F_2 avaliadas para a segregação de endosperma, uma delas apresentou desvio de segregação significativo em nível de 5%, como consequência do aumento da frequência de sementes mutantes waxy. Este desvio pode ser devido à ocorrência de instabilidade germinal nesta progênie, confirmando a existência deste fenômeno no germoplasma Ast222, como previamente descrito (Branquinho, 1993). Portanto, além de instabilidade somática, foi também observada instabilidade germinal na geração F_2 (Ast222wx-P147 x L222). A frequência de sementes normais com setores wx foi relativamente alta nestas progênies F_2 , ocorrendo em níveis acima de 20% em 11 espigas. Apenas uma espiga (E_{35}) de aproximadamente 50 obtidas na geração F_2 não apresentou semente com instabilidade.

Tabela 3. Frequências de espigas com instabilidade somática de progênies F₁ resultantes de cruzamentos da linhagem Ast222wx com as linhagens L222 e Ast-o2.

Cruzamento	N° de Espigas	
	Estáveis	Instáveis
Ast222wxwx <i>AeAe</i> x L222 (P147)	0	2 ^a
Ast222wxwx <i>Ae-</i> x L222 (Várias progênies)	18	5 ^b
Ast222wxwx <i>AeAe</i> x Ast-o2 (Várias progênies)	7	1 ^b

^a = Aproximadamente 90% das sementes F1 de cada espiga apresentaram setores waxy de diversos tamanhos.

^b = Espigas com todas as sementes normais e apenas 1-2 sementes com instabilidade somática para o loco waxy.

Tabela 4- Frequências dos fenótipos normal e waxy observadas em 17 espigas representando as progênie segregantes F₂(Ast222wx-P147 x L222). No teste de χ^2 foi avaliada a hipótese de segregação monofatorial de 3N:1wx. A instabilidade somática foi observada apenas como setores waxy em grãos normais.

Progênie F ₂	N ^o de sementes			waxy	χ^2 g.l. = 1
	Normal		Total		
	Estável	Instável			
E ₃	186	26 (12.3%)	212	75	0.20 ns
E ₅	97	56 (36.6%)	153	76	8.18**
E ₈	150	1 (0.7%)	151	63	2.24 ns
E ₁₁	88	8 (8.3%)	96	42	2.17 ns
E ₁₃	221	92 (40.9%)	225	65	1.03 ns
E ₁₄	127	58 (31.4%)	185	64	0.05 ns
E ₁₅	149	39 (20.7%)	188	68	0.33 ns
E ₂₁	230	17 (6.9%)	247	76	0.37 ns
E ₂₂	55	17 (23.6%)	72	16	2.18 ns
E ₂₄	169	89 (34.5%)	258	74	1.30 ns
E ₂₅	194	50 (20.5%)	244	77	0.17 ns
E ₂₈	197	54 (21.5%)	251	65	3.31 ns
E ₂₉	166	35 (17.4%)	201	56	0.48 ns
E ₃₃	36	6 (14.3%)	42	19	1.23 ns
E ₃₄	203	53 (20.7%)	256	77	0.63 ns
E ₃₅	50	0 (0%)	50	23	1.65 ns
E ₃₈	132	103 (43.8%)	235	72	0.39 ns

ns = χ^2 não significativo.

** χ^2 significativo a nível de 5%.

O amido do endosperma normal é composto de amilose e amilopectina. A identificação do fenótipo mutante da via biossintética de carboidratos em endosperma é de fácil visualização, pois a ausência ou a alteração nas proporções de um dos tipos de amido altera a constituição física da semente. Um exemplo é o mutante *waxy*, que não possui amilose e o fenótipo da semente é sem brilho, tipo cera. Assim, a classificação do fenótipo mutante é evidente também em endosperma normal com setor mutante. De 50 espigas F_2 (Ast222wx-P147 x L222) obtidas, quase todas apresentaram sementes normais com setores wx. Os setores mutantes no endosperma normal destas espigas eram de tamanhos variados, como pode ser observado na Figura 3. A ocorrência de setores mutantes em endosperma normal deve-se a eventos de instabilidade somática do gene nas células que estão em divisão mitótica durante o desenvolvimento do endosperma. Assim, quanto mais cedo ocorrer a mutação no desenvolvimento do endosperma, maior será o setor mutante. Exemplo de ocorrência de instabilidade do gene *waxy* em uma fase inicial do desenvolvimento do endosperma pode ser observado na Figura 4a. Além da fácil identificação visual sem tratamento químico da mutação no gene *waxy*, pode-se utilizar a reação de coloração com iodo para uma melhor caracterização desta mutação. Dos dois tipos de amido do endosperma de milho, apenas a amilose reage com o iodo resultando em uma coloração azul-escuro ou preto. Como a amilopectina não reage, a semente fica com a cor natural. Já que o mutante *wx* não possui amilose, as células com esta mutação não reagem com o iodo. Assim, os setores mutantes não corados são facilmente reconhecidos no endosperma normal corado (Figura 4c, 4e, 4g). A ocorrência de mutações somáticas no gene *waxy* em estágios intermediários (Figura 4b e 4d) e avançados (Figura 4f) do desenvolvimento do endosperma resultam em setores mutantes de tamanhos médios e pequenos, respectivamente.



Figura 3- Instabilidade somática em progênies F_2 (Ast222wx-P147 x L222). Observar as várias sementes normais com setores waxy de diversos tamanhos (setas).



Figura 4- Sementes normais de milho com setores waxy provenientes de mutações somáticas. (a) Semente normal de uma progênie Ast222 com um grande setor waxy; As sementes b-g são provenientes de progênies F_2 (Ast222wx-P147 x L222). (b) Semente normal com dois grandes setores waxy; (c) Semente b lixada e corada com iodo; (d) Semente normal com um grande setor waxy e vários pequenos; (e) Semente d lixada e corada com iodo; (f) Semente normal com pequenos setores waxy; (g) Semente f lixada e corada com iodo.

Um experimento foi realizado com o objetivo de estudar a frequência de reversão da mutação *waxy* para endosperma normal e, ao mesmo tempo, identificar plantas com o sistema de instabilidade genética ativo. Assim, foi plantado um campo isolado com aproximadamente 1.000 plantas Ast222(S11) de genótipo *wxwx/Ae-* para se avaliar a possível reversão do fenótipo mutante *waxy* para o fenótipo normal. Nenhuma reversão da mutação *waxy* para o fenótipo normal foi observada nas milhares (>150.000) de sementes das progênie S12 desse experimento. Todas as progênie obtidas possuíam apenas sementes mutantes, demonstrando uma alta estabilidade para a mutação *waxy* neste germoplasma. Também interessante nos resultados desse experimento foi o aparecimento de várias sementes *waxy* com setores enrugados (Figura 5). Estes setores enrugados representam um fenótipo típico da ocorrência de mutação dupla nos genes *wx* e *ae*. Neste caso, o setores enrugados são resultantes da instabilidade no loco *Ae*. Setores duplo-mutantes *wxwx/aeae* foram observados em 17 sementes dessas progênie S13, em uma frequência baixa e semelhante àquela observada em gerações prévias da linhagem Ast222.

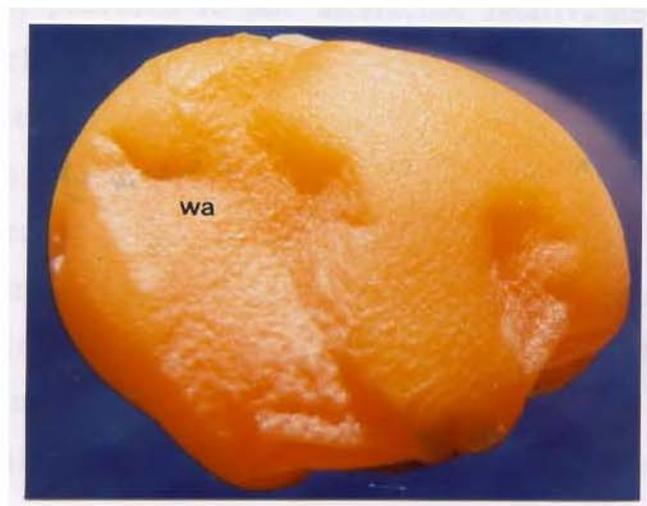


Figura 5- Semente de uma progênie da linhagem Ast222 *wxwx/Aeae* autofecundada. Observar setores enrugados, que indicam instabilidade somática no loco *Ae* resultando em setores duplo-mutantes *wxwx/aeae* (wa).

4.2- Análise molecular do loco *waxy*

Aproximadamente 80 progênies da linhagem Ast222 (S10-S12), resultantes de autofecundação, e progênies F₁ e F₂(Ast222wx-P147 x L222) com alta frequência de setores *waxy* em endosperma normal, foram utilizadas nas análises moleculares da instabilidade do loco *waxy*. A associação das características fenotípicas de endosperma com as análises moleculares foi, sempre que possível, uma abordagem constante no planejamento dos experimentos.

4.2.1- Avaliação de polimorfismo de restrição do loco *waxy*

Inicialmente, procurou-se por alterações relativamente grandes na sequência de nucleotídeos do alelo *waxy* da linhagem Ast222, que pudessem ser detectadas em fragmentos de restrição. Para tanto, foi novamente considerada a hipótese mais provável de que o alelo mutante *waxy* da Ast222 seria resultante de eventos de inserção de um transposon ou talvez de alguma outra alteração molecular envolvendo um número grande de bases. Esta hipótese baseou-se nas observações de instabilidade somática e germinal, comumente associadas à ação de elementos de transposição em milho. Amostras de DNA genômico foram tratadas com diversas endonucleases para determinar o padrão de restrição de progênies normais e *waxy* da linhagem Ast222 e das linhagens parentais Ast-o2 e L222. As análises de polimorfismo de restrição tiveram também o objetivo de verificar se existiam diferenças entre os alelos mutantes *waxy* nas diversas sublinhagens Ast222. O padrão de restrição da linhagem Ast222 também foi comparado com outras linhagens endogâmicas de milho descritas na literatura.

A Figura 6 representa um autorradiograma resultante da hibridização de amostras de DNA das linhagens Ast222 normal (*Wxwx*), Ast222wx (*wxwx*), Ast-o2 (*WxWx*) e L222 (*WxWx*) digeridos com a endonuclease de restrição *HindIII* e hibridizados com a sonda cDNA *Wx*. Nas sublinhagens

Ast222wx foi observado apenas um fragmento de 6kb com homologia à sonda cDNAWx (Figura 6, colunas 1-3 e 7-9). Portanto, não foram detectadas diferenças na posição do sítio *HindIII* entre as diversas sublinhagens Ast222wx. Aparentemente, não existe sítio para esta endonuclease dentro da sequência codificadora waxy dos mutantes. No genótipo normal (*Wxwx*) da linhagem Ast222 foram observados fragmentos de 10, 6 e 2.3kb homólogos à sonda cDNAWx (Figura 6, coluna 6). Os fragmentos de 10 e 2.3kb provavelmente correspondem ao alelo *Wx*, enquanto que o fragmento de 6kb parece corresponder ao alelo *wx* neste genótipo heterozigoto. Este resultado indicou uma alteração na posição do sítio *HindIII* entre os alelos normal e mutante da linhagem Ast222 e a existência de um sítio *HindIII* dentro da região codificadora do alelo *Wx* desta linhagem.

Na amostra de DNA do parental L222 tratada com a endonuclease *HindIII* foi observado um fragmento de 15kb e outro de 2.3kb homólogos à sonda de cDNAWx (Figura 6, coluna 5). O parental Ast-o2 apresentou três fragmentos com homologia à sonda cDNAWx (Figura 6, coluna 4). Os fragmentos são de 20, 10 e 2.3kb.

Os padrões de restrição das amostras de DNA das linhagens Ast222, L222 e Ast-o2 permitem concluir que existe polimorfismo para sítios de restrição *HindIII* entre os alelos dos genótipos avaliados. Aparentemente, dois sítios *HindIII* são bastante conservados dentro da região codificadora do alelo normal destas três linhagens, gerando constantemente um fragmento de 2.3kb (Figura 6, colunas 4, 5 e 6).

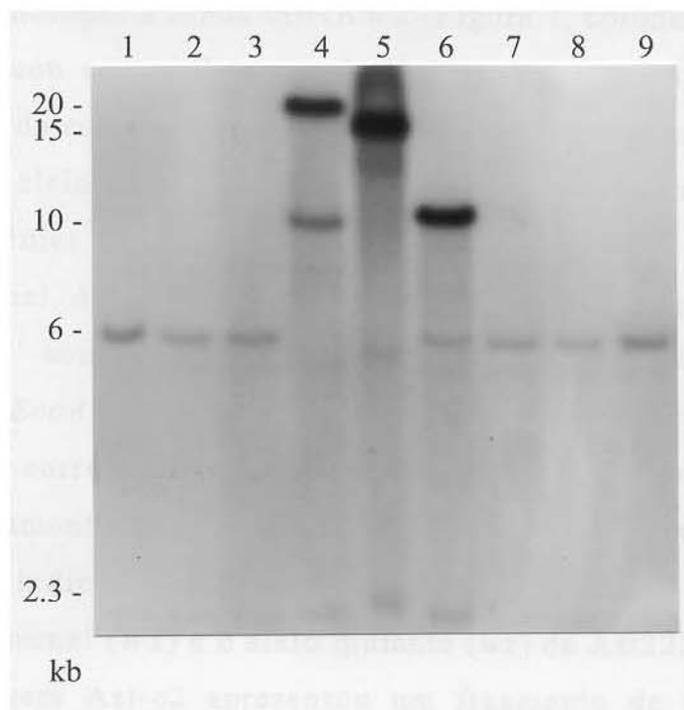


Figura 6- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho, digeridas com a endonuclease *HindIII* e hibridizadas com a sonda cDNA Wx. Coluna 1-3 e 7-9 = Ast222wx; 4 = Ast-o2; 5 = L222 e 6 = Ast222 normal (*Wxwx*).

Na Figura 7 está representado um autorradiograma resultante da hibridização de amostras de DNA genômico das linhagens Ast-o2, L222 e Ast222 normal e waxy, digeridas com a endonuclease de restrição *EcoRV* e hibridizadas com a sonda cDNAWx. A digestão com a endonuclease *EcoRV* das diversas progênes Ast222wx resultou em apenas um fragmento de 3.9kb com homologia à sonda cDNAWx (Figura 7, colunas 1-3 e 7-9). Este resultado indicou que o alelo wx da linhagem Ast222 não possui o sítio *EcoRV* dentro da região codificadora do gene. Além disso, os sítios *EcoRV* associados ao alelo wx encontram-se aparentemente na mesma posição em todas as progênes mutantes, gerando o mesmo tamanho de fragmento. O genótipo normal da Ast222 (*Wx*-) apresentou três fragmentos de DNA homólogos à sonda cDNAWx, resultantes do tratamento com a endonuclease *EcoRV* (Figura 7, coluna 6). Os fragmentos de 10 e 2.3kb provavelmente correspondem ao alelo funcional, enquanto que o fragmento de aproximadamente 4kb provavelmente corresponde ao alelo mutante. Este resultado indicou que existem diferenças na posição dos sítios *EcoRV* entre o alelo normal (*Wx*) e o alelo mutante (*wx*) da Ast222.

A linhagem Ast-o2 apresentou um fragmento de 12kb e outro de 2.3kb homólogos à sonda cDNAWx, quando o DNA genômico foi tratado com a endonuclease *EcoRV* (Figura 7, coluna 4). Na linhagem L222 o fragmento com homologia à sonda cDNAWx é de 8kb. Portanto, existe polimorfismo entre as linhagens Ast222, L222 e Ast-o2 para sítios de restrição *EcoRV*. Por outro lado, foram observados sítios de restrição *EcoRV* aparentemente conservados dentro da região codificadora entre os genótipos Ast-o2 e Ast222 normal, como sugerido pelo fragmento de aproximadamente 2.3kb nas linhagens (Figura 7, colunas 4 e 6, respectivamente).

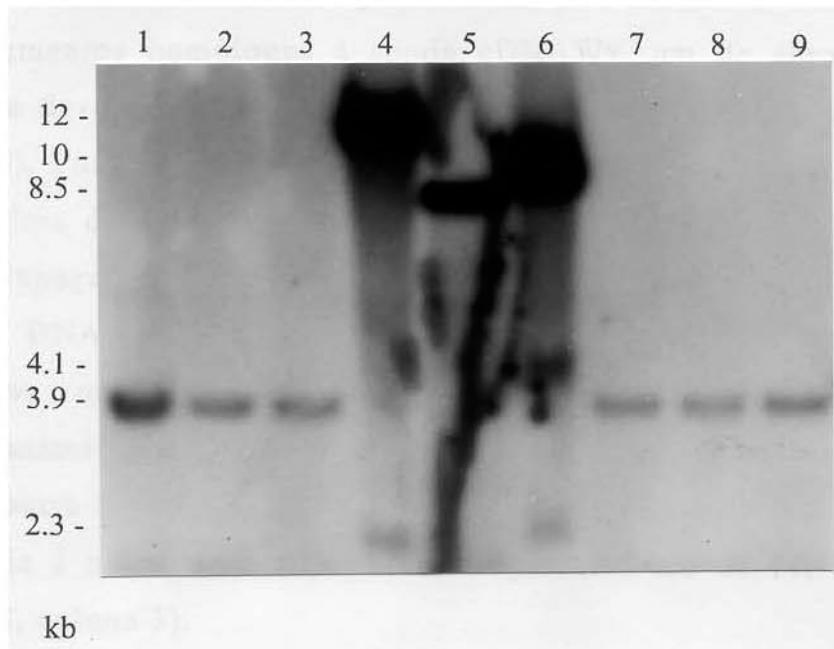


Figura 7- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho, digeridas com a endonuclease *EcoRV* e hibridizadas com a sonda de cDNA Wx. Coluna 1 -3 e 7-9 = Ast222wx; 4 = Ast-o2; 5 = L222; 6 = Ast222 normal (*Wxwx*).

A Figura 8 representa um autorradiograma de amostras de DNA das linhagens Ast-o2, L222 e Ast222 normal e waxy, digeridas com a endonuclease de restrição *XhoI*, e hibridizadas com a sonda de cDNA W_x . As amostras de DNA das plantas Ast222wx (*wxwx*) apresentaram um fragmento de 11kb com homologia à sonda cDNA W_x (Figura 8, colunas 1,2 e 6-9). Por outro lado, o genótipo Ast222 normal (*Wxwx*) apresentou três fragmentos homólogos à sonda cDNA W_x , um de aproximadamente 11kb que deve conter o alelo *wx* e dois outros com 9 e 4.8kb (Figura 8, coluna 5). Portanto, um sítio de restrição *XhoI* presente dentro da região codificadora do alelo *Wx* da Ast222 parece não existir no alelo *wx* desta mesma linhagem.

O DNA da linhagem L222 tratado com a endonuclease *XhoI* apresentou um fragmento de aproximadamente 13kb e outro de aproximadamente 15kb com homologia à sonda cDNA W_x (Figura 8, coluna 4). Por outro lado, a linhagem Ast-o2 apresentou quatro fragmentos com homologia à sonda cDNA W_x . Estes fragmentos são de 11, 8.5, 6 e 4kb (Figura 8, coluna 3).

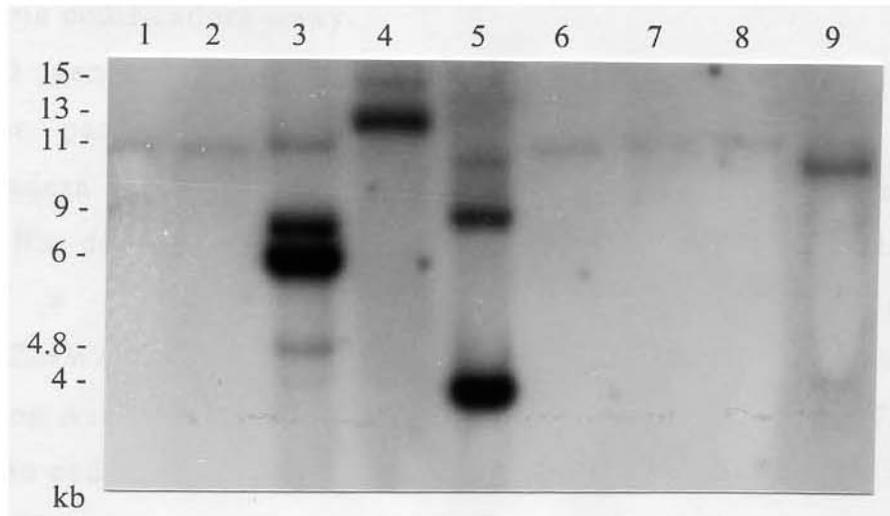


Figura 8- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho, digeridas com a endonuclease *XhoI* e hibridizadas com a sonda de cDNA Wx. Coluna 1, 2 e 6-9 = Ast222wx; 3 = Ast-o2; 4 = L222; 5 = Ast222 normal (*Wxwx*).

A avaliação do padrão de restrição de DNA genômico com as endonucleases *HindIII*, *EcoRV* e *XhoI* demonstrou ausência de polimorfismo de restrição para essas enzimas no alelo *waxy* entre as diferentes sublinhagens (Figuras 6-8). Porém, existem diferenças na posição dos sítios destas endonucleases entre o alelos *Wx* e *wx* da Ast222. Aparentemente, o mutante perdeu alguns sítios destas enzimas na sequência codificadora *waxy*.

O genótipo Ast222wx aparentemente não apresentou sítios de restrição para as endonucleases *HindIII* e *EcoRV* dentro da região codificadora do gene *waxy* (Figuras 6 e 7). O mesmo foi observado em alelos *Wx* descritos na literatura, que não possuem sítio de restrição *HindIII* e *EcoRV* (Shure *et al.*, 1983; Klösgen *et al.*, 1986; EMBL,ZMWAXY, acesso X03985, M24258). Em contraste, o alelo *Wx* das linhagens Ast222 normal, L222 e Ast-o2 possuem sítios *HindIII* e *EcoRV* na região codificadora deste gene.

Diferentemente do descrito na literatura para o alelo normal, o alelo mutante *waxy* da linhagem Ast222 parece não apresentar sítio de restrição *XhoI* dentro da sequência codificadora. Na sequência da linhagem W22 (Klösgen *et al.*, 1986) existem dois sítios *XhoI*, um na posição 2326 e outro na 2910. No mapa de restrição do clone *Wx* isolado do F₂(W23 x K55) existe um sítio *XhoI* antes da terminação 3' do gene (Shure *et al.*, 1983). O mesmo deve ocorrer com o alelo *Wx* do genótipo Ast222 normal e da linhagem Ast-o2, que apresentaram um sítio *XhoI* dentro da sequência codificadora (Figura 8, colunas 5 e 3).

A obtenção de progênies com alta frequência de sementes normais com setores *waxy*, e os polimorfismos de restrição observados entre os genótipos estudados estimularam a continuidade deste estudo para caracterizar o sistema gerador de instabilidade do loco *waxy* na linhagem Ast222. As progênies F₁(Ast222wx-P147 x L222) com alta instabilidade foram avaliadas por Southern, pois até então não haviam sido observadas

frequências tão elevadas de sementes com instabilidade somática no germoplasma Ast222. Estas progênes com alta instabilidade no loco *waxy* foram inicialmente avaliadas por Southern blot, com o objetivo de verificar a possibilidade de ocorrência de diferentes alelos do gene *waxy*.

Na Figura 9 está representado um autorradiograma resultante da hibridização de amostras de DNA das linhagens Ast-o2 , L222, Ast222wx-P147 e de plantas F_1 (Ast222wx-P147 X L222) digeridas com a endonuclease de restrição *EcoRI* e hibridizadas com sonda cDNA_{Wx}. Os tamanhos de fragmentos originados com a restrição *EcoRI* foram de 14kb na linhagem Ast-o2, 12kb na linhagem L222, e 17kb na sublinhagem Ast222wx-P147 (Figura 9, colunas 1-3). As plantas F_1 (Ast222wx x L222) aparentemente apresentaram os mesmos fragmentos de 12 e 17Kb, correspondentes aos parentais Ast222wx-P147 e L222 (Figura 9, colunas 4-12). Em um dos genótipos F_1 (Figura 9, coluna 10) pode ser observada uma banda fraca correspondente a um fragmento de ~10kb, que é diferente dos parentais. Este resultado poderia indicar que ocorreu uma alteração no sítio de restrição *EcoRI* nesta planta F_1 . Esta alteração pode ser decorrente do surgimento de um novo sítio *EcoRI* dentro do gene *waxy*, ou em regiões flaqueadoras, associado aos eventos de instabilidade frequentes neste loco nas progênes F_1 (Ast222wx-P147 x L222).

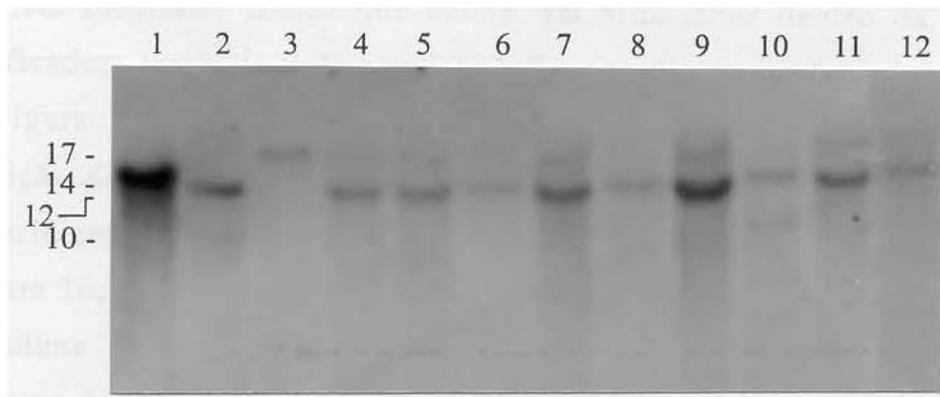


Figura 9- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho, digeridas com a endonuclease *EcoRI* e hibridizadas com a sonda de cDNA Wx. Coluna 1 = Ast-o2; 2 = L222; 3 = Ast2222wx-P147; 4-12 = F₁(Ast222wx-P147 x L222).

A Figura 10 mostra os resultados da hibridização, com a sonda cDNA W_x , de amostras de DNA digeridas com a endonuclease de restrição *XhoI*. A sublinhagem Ast222wx-P147 tratada com esta endonuclease apresentou apenas um fragmento de 11kb com homologia à sonda waxy (Figura 10, coluna 2). Este resultado também pode ser observado na Figura 8 (coluna 1). A restrição de DNA da linhagem L222 com *XhoI* gerou fragmentos de 13 e 15kb homólogos à sonda cDNA W_x (Figura 10, coluna 1). Este resultado indica que existe um sítio *XhoI* dentro da sequência codificadora waxy da linhagem L222. Este resultado também foi observado na Figura 8 (coluna 4). O alelo W_x da Ast222 também possui sítio de restrição *XhoI* dentro da sequência codificadora, pois a digestão com *XhoI* e hibridização com sonda cDNA W_x resultou em fragmentos de 9 e 4.8kb (Figura 10, coluna 9). Resultado semelhante pode ser observado na Figura 8 (coluna 5). A posição do sítio *XhoI* dentro da sequência waxy do genótipo Ast222 normal, aparentemente, não corresponde àquela observada para os genótipos Ast222wx e L222. As amostras das colunas 3-8 da Figura 10 são de plantas F_1 (Ast222wx-P147 x L222) digeridas com a endonuclease *XhoI*, que apresentaram três fragmentos com homologia à sonda cDNA W_x . Os fragmentos são de 15, 13 e 11kb. Estes fragmentos são do mesmo tamanho daqueles observados nos parentais Ast222wx e L222. Porém, o genótipo F_1 , da coluna 8 na Figura 10, aparentemente apresenta um quarto fragmento homólogo ao cDNA W_x , este fragmento é de ~8.7kb. A diferença de tamanho deste fragmento com relação ao observado nos parentais e em outros indivíduos pode indicar a alteração na posição do sítio *XhoI*. Esta alteração poderia ser decorrente do surgimento de um novo sítio *XhoI* na sequência codificadora gerando assim um novo alelo waxy nesta planta F_1 . Ou ainda, este novo sítio *XhoI* pode estar em regiões flangeadoras do gene. Como as plantas F_1 apresentam alta frequência de instabilidade somática no gene waxy, a geração deste novo sítio *XhoI* pode estar relacionada com a instabilidade deste loco.

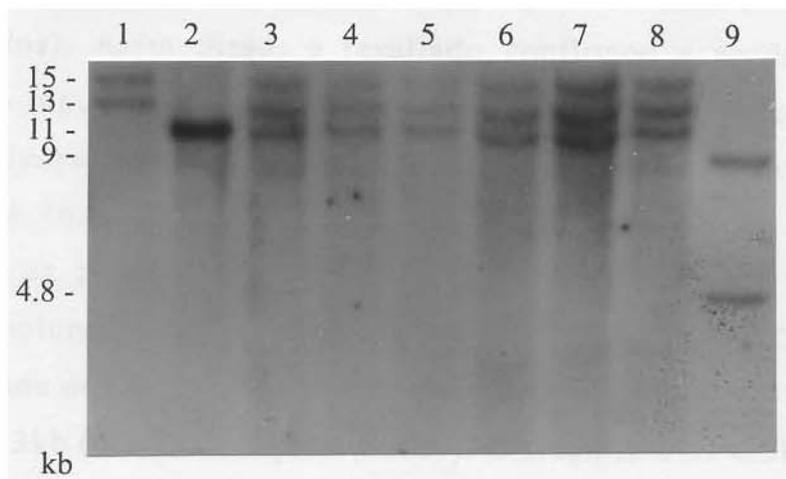


Figura 10 - Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho digeridas com a endonuclease *XhoI* e hibridizadas com a sonda de cDNA *Wx*. Coluna 1 = L222; 2 = Ast222wx-P147; 3 e 8 = F₁(Ast222wx-P147 x L222); 9 = Ast222 normal (*WxWx*).

A Figura 11 representa um autorradiograma de amostras de DNA extraídas de tecido foliar e de endosperma imaturo que apresentavam instabilidade fenotípica no loco *waxy*. Neste experimento, a digestão do DNA da sublinhagem Ast222wx com *HindIII* gerou apenas um fragmento de 6kb com homologia à sonda da região 3' do gene correspondente à Sonda 2 (Figura 11, coluna 8) e da região promotora (Sonda 1- dados não apresentados). Além disso, o resultado confirmou a perda de um sítio *HindIII* na região codificadora do alelo *wx* da Ast222, como observado na Figura 6 (colunas 1-3 e 7-9). A linhagem L222 tratada com *HindIII* e hibridizada com a Sonda 2 apresentou um fragmento de 15kb, como o observado na hibridização com a sonda cDNAWx (Figura 11, coluna 9; Figura 6, coluna 5). Porém, a hibridização da linhagem L222 com a Sonda 1, apresentou dois fragmentos homólogos à sequência *waxy*, um de 6.5kb e outro de 2.3kb (dados não apresentados). O fragmento de 6.5kb também foi observado de maneira tenue na hibridização com a Sonda 2 (Figura 11, coluna 9). O fragmento de 2.3kb deve possuir uma porção codificadora do gene *waxy*, além da sequência do promotor. Este fragmento foi visualizado em hibridizações com as sondas de cDNAWx e Sonda 1. A não observação deste fragmento de 2.3kb em hibridização com a Sonda 2 parece indicar que este fragmento de 2.3kb não possui a sequência codificadora a partir do nucleotídeo 2100.

As outras amostras de DNA deste experimento são do genótipo F₁(Ast222wx-P147 x L222) que apresentaram instabilidade no loco *waxy*. Os genótipos F₁ tratados com a endonuclease *HindIII* apresentaram fragmentos de 15 e 6kb homólogos à Sonda 2 (Figura 11, colunas 2-7). Estes fragmentos são os mesmos observados nos seus parentais (Figura 11, colunas 8 e 9). Em um dos genótipos F₁ (Figura 11, coluna 1) foi observado um fragmento de 8kb diferente dos parentais, além dos fragmentos de 15 e 6kb. Este resultado talvez indique que ocorreu uma alteração no sítio de restrição *HindIII* nesta planta F₁. A possível alteração

do sítio *HindIII* nesta planta pode ser devido ao surgimento de um novo alelo *waxy*, diferente dos parentais Ast222wx-P147 e L222. Ou ainda, este fragmento extra pode ter surgido da criação de um novo sítio *HindIII* em regiões flanqueadoras deste gene. Este novo sítio de reconhecimento da endonuclease *HindIII* pode ter sido originado por eventos de mutação do gene *waxy* amplamente observadas nas progênies F₁(Ast222wx-P147 x L222).

Neste experimento, cujos resultados estão apresentados na Figura 11, foi utilizado DNA extraído de folha (colunas 1-5) e também de endosperma imaturo (colunas 6-9). Foram utilizados estes dois tecidos para se comparar o padrão de restrição em tecido onde o gene *Wx* instável está se expressando, com tecido onde não ocorre expressão deste gene. Verificou-se que a o padrão de restrição com *HindIII* em folha e em endosperma é o mesmo.

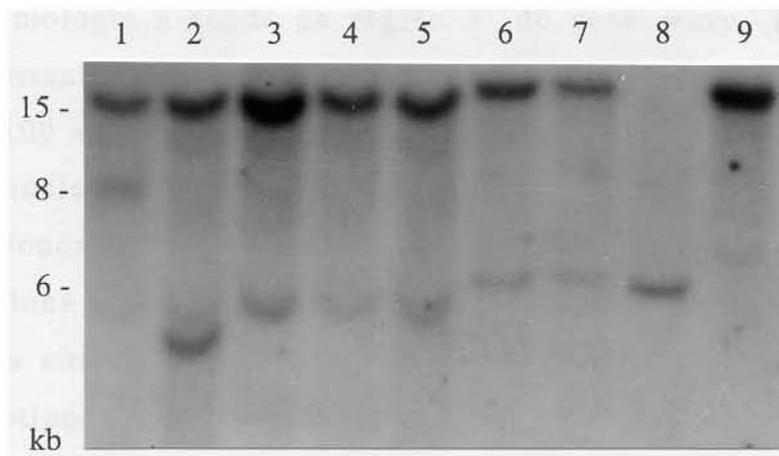


Figura 11 - Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho digeridas com a endonuclease *HindIII* e hibridizadas com Sonda 2. Colunas 1-5 = F₁ (Ast222wx-P147 x L222); 6 e 7 = F₂(Ast222wx-P147 x L222); 8 = Ast222wx-P147; 9 = L222.

Na Figura 12 está representado um autorradiograma resultante da hibridização de amostras de DNA, com tratamento simultâneo com duas endonucleases, *HindIII* e *SalI* ou *EcoRI* e *PvuII*, hibridizadas com a sonda da região 3' do gene *waxy* (Sonda 2). Neste Southern blot foi utilizado DNA extraído de folha (Figura 12, colunas 5, 6, 10) e de endosperma imaturo (Figura 12, colunas 1-4, 7-9). A sublinhagem Ast222wx-P147 tratada com as endonucleases *HindIII* e *SalI* apresentou um fragmento de 1.5kb com homologia à sonda da região 3' do gene *waxy* (Figura 12, coluna 3). Portanto, este fragmento deve conter alguma sequência do nucleotídeo 2100 ao 4519 do gene *waxy*. A linhagem L222 quando tratada com as endonucleases *HindIII* e *SalI* apresentou três fragmentos com homologia à Sonda 2, um de 9kb, outro de 1.9kb e um terceiro de 0.6kb (Figura 12, coluna 4). Estes resultados novamente indicaram uma mudança de posição dos sítios *HindIII* e *SalI* na Ast222wx, comparando-se com a L222. Os genótipos F₁ e F₂(Ast222wx-P147 x L222) com instabilidade no loco *waxy* tratados com *HindIII* e *SalI* aparentemente apresentam os mesmos fragmentos com homologia à Sonda 2 presentes em ambos os parentais (Figura 12, colunas 1,2 e 5). Uma progênie F₁ aparentou ter um padrão de restrição distinto dos parentais, devido ao aparecimento de um fragmento extra de 1kb homólogo à Sonda 2 (Figura 12, coluna 6). Este fragmento pode ter sido gerado pelo surgimento de um novo sítio de reconhecimento para as endonucleases *HindIII* e *SalI* na sequência *waxy* desta planta. Este novo sítio pode ser decorrente do surgimento de um novo alelo do gene *waxy* devido às instabilidades constantemente observadas neste loco nas progênies F₁.

A digestão da sublinhagem Ast222wx com as endonucleases *EcoRI* e *PvuII* resultou em um fragmento de 2.4kb com homologia à Sonda 2 (Figura 12, coluna 8). A digestão da linhagem L222 com estas mesmas endonucleases resultou em três fragmentos com homologia à Sonda 2. Estes fragmentos são de 5, 2.4 e 1.4kb (Figura 12, coluna 9). As plantas F₁

e F₂(Ast222wx x L222) com muitas sementes normais contendo setores wx (como na Figura 3) apresentaram os mesmos fragmentos com homologia à Sonda 2 que os parentais (Figura 12, coluna 7 e 10). Este resultado demonstrou que não houve alteração dos sítios *EcoRI* e *PvuII* na sequência waxy das progênes F₁ comparando-se com os parentais Ast22wx-P147 e L222. O padrão de restrição do DNA genômico das plantas instáveis foi semelhante aos parentais tanto em amostras de DNA extraídas de tecido foliar como de endosperma. Ou seja, o padrão de restrição no tecido onde ocorre expressão do gene *waxy* é o mesmo do tecido onde este gene não se expressa.

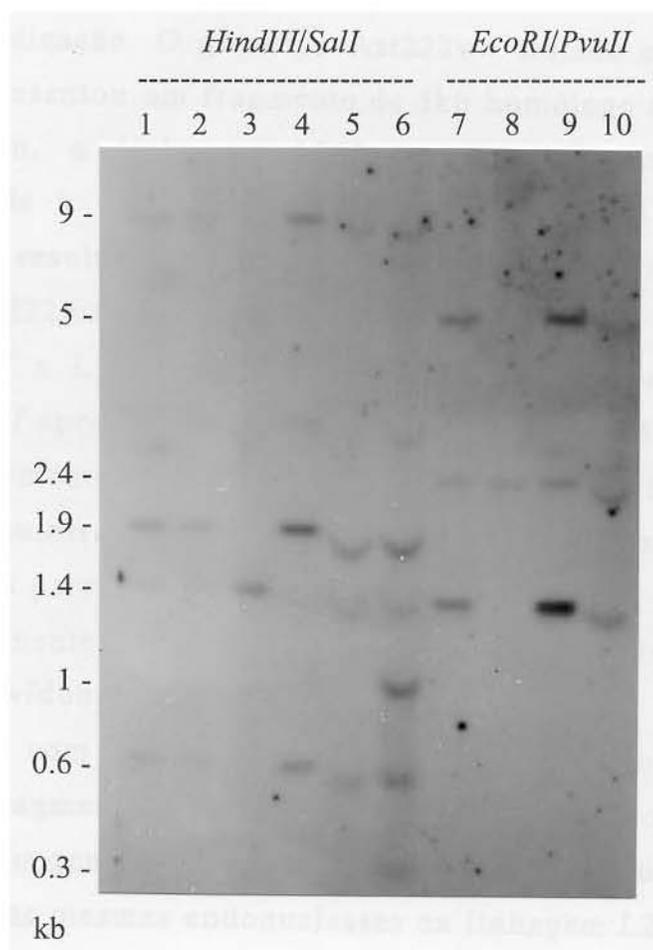


Figura 12- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho, com digestões duplas de *HindIII* e *SalI*, *EcoRI* e *PvuII* hibridizadas com a Sonda 2. Colunas 5, 6 e 10 = F₁(Ast222wx-P147 x L222); 1, 2 e 7 = F₂(Ast222wx-P147 x L222); 3 e 8 = Ast222wx-P147; 4 e 9 = L222

A Figura 13 representa o autorradiograma da hibridização de amostras de DNA com tratamento simultâneo com as endonucleases *HindIII* e *Sall* ou *EcoRI* e *PvuII*, hibridizadas com a sonda da região promotora (Sonda 1). Esta membrana é a mesma utilizada na Figura 12, apenas com a mudança da sonda utilizada na hibridização. O genótipo Ast222wx tratado com as endonucleases *HindIII* e *Sall* apresentou um fragmento de 3kb homólogo à Sonda 1 (Figura 13, coluna 3). Porém, a linhagem L222 apresentou quatro fragmentos com homologia à Sonda 1. Estes fragmentos são de 6, 3.8, 3 e 1.5kb (Figura 13, coluna 4). Estes resultados indicam que alguns sítios *HindIII* e *Sall* estão ausentes na Ast222wx comparando-se com a L222. Os genótipos F₁ e F₂(Ast222wx-P147 x L222) com instabilidade no loco *waxy*, quando tratados com *HindIII* e *Sall* apresentaram os fragmentos de 3 e 1.5kb com homologia à Sonda 1 e aparentemente os fragmentos de 3.8kb também (Figura 13, colunas 1, 2, 5 e 6). Neste autorradiograma, um fragmento de aproximadamente 3kb foi observado nos dois parentais, porém o fragmento de 1.5kb está presente apenas na L222. Aparentemente, apenas o fragmento de 6kb encontrado na L222 não foi observado nos indivíduos F₁.

O tratamento com as endonucleases *EcoRI* e *PvuII* do genótipo Ast222wx resultou em um fragmento de 1.8kb com homologia à sonda proveniente da região promotora do gene *waxy* (Sonda 1) (Figura 13, coluna 8). Entretanto, o tratamento com estas mesmas endonucleases na linhagem L222 resultou em dois fragmentos com homologia à sonda 1, um fragmento de ~1.8kb e outro de 7.5kb (Figura 13, coluna 9). As plantas F₁ e F₂(Ast222wx-P147 x L222) apresentaram aparentemente os mesmos fragmentos com homologia à Sonda 1 que os seus parentais (Figura 13, colunas 7, 10 e 11).

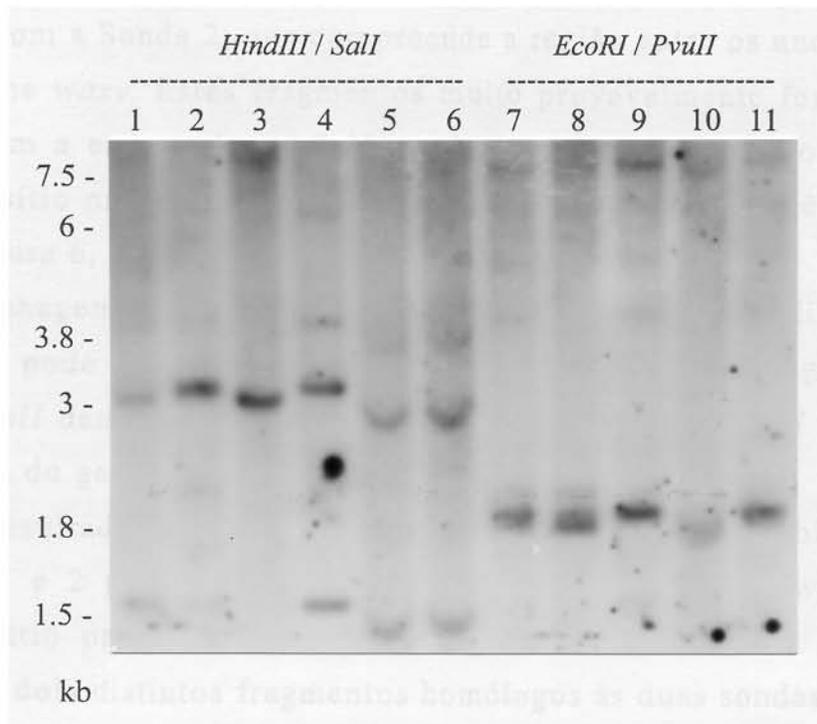


Figura 13- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho, com digestões duplas de *HindIII* e *SalI*, *EcoRI* e *PvuII* e hibridizadas com a Sonda 1. Colunas 5, 6 e 10 = F₁(Ast222wx-P147 x L222); 1, 2, 7 e 11 = F₂(Ast222wx-P147 x L222); 3 e 8 = Ast222wx-P147; 4 e 9 = L222.

Avaliando-se conjuntamente os resultados das Figuras 12 e 13 podemos verificar que o genótipo Ast222wx possui um sítio *Sall* dentro da região codificadora, pois este sítio gerou dois fragmentos com homologia à sonda *waxy*. O fragmento de 3kb deve corresponder à região promotora, pois ele foi observado apenas na hibridização com a Sonda 1. Por outro lado, o fragmento de 1.4kb deve corresponder à uma parte da região codificadora, pois ele apenas foi observado com a Sonda 2, que compreende a região entre os nucleotídeos 2100 e 4519 do gene *waxy*. Estes fragmentos muito provavelmente foram gerados pela restrição com a endonuclease *Sall*, tendo em vista que a endonuclease *HindIII* não possui sítio na região codificadora do gene *waxy* nas progênes mutantes da Ast222 (Figura 6, colunas 1-3 e 7-9).

Na linhagem L222 existe um sítio *HindIII* na região codificadora do gene *waxy*, como pode ser observado na Figura 6 (coluna 5). A digestão dupla com *HindIII* e *Sall* demonstra então, que existem vários sítios *Sall* dentro da região codificadora do gene *waxy* na linhagem L222.

Nos resultados da digestão dupla com *EcoRI* e *PvuII* e hibridizações com as Sondas 1 e 2 podemos observar que no genótipo Ast222wx aparentemente existe um sítio para *PvuII* dentro da região codificadora do gene *waxy*, pois observou-se dois distintos fragmentos homólogos às duas sondas. Aparentemente não existe sítio *EcoRI* na região codificadora do alelo *wx* na Ast222wx e também no alelo *Wx* da linhagem L222, como pode ser observado na Figura 9 (coluna 3 e 2, respectivamente). Na linhagem L222 deve existir ao redor de 4-5 sítios *PvuII* dentro da sequência codificadora, pois observou-se 4 ou 5 distintos fragmentos homólogos às duas sondas. Nos genótipos F₁ e F₂ o padrão de restrição para a endonuclease *PvuII* foi semelhante aos parentais.

As plantas F₁(Ast222wx-P147 x L222) e também os endospermas F₂ utilizados nos experimentos de Southern blot das Figuras 9-13 eram provenientes de várias sementes normais com muitos setores *waxy*. Portanto, apresentavam alta frequência de instabilidade no loco *waxy* em nível de endosperma. As diferentes plantas F₁ quando tratadas com as endonucleases *EcoRI*, *XhoI*, *HindIII*, *EcoRI/PvuII* e *HindIII/Sall* apresentaram, em geral, o

mesmo padrão de restrição que os parentais para o loco *waxy*, pois os mesmos tamanhos de fragmentos homólogos à sonda *waxy* foram observados entre eles. De acordo com estes resultados, pode-se sugerir que a instabilidade do loco *waxy* observada deve estar associada ao genótipo Ast222wx, que teria gerado instabilidade somática e germinal nas progênies, considerando-se que a linhagem L222 tem apresentado um comportamento genético estável por muitas (>15) gerações.

4.2.2- Avaliação do loco *waxy* por PCR

Uma das estratégias utilizadas para a caracterização e possível clonagem do sistema de instabilidade genética da linhagem Ast222 foi a tentativa de amplificação do loco *waxy* por PCR. O emprego desta metodologia permitiria uma avaliação mais rápida do gene *waxy*, pois os fragmentos amplificados poderiam ser diretamente clonados e posteriormente sequenciados.

Utilizando a combinação dos primers 2688/3874 (Tabela 1) foi amplificado um fragmento de 1,2 kb do gene *waxy* nas linhagens Ast222 normal (Figura 14, colunas 2-4) e na L477wx (Figura 14, coluna 1). Também ocorreu amplificação nas sementes normais com setores *waxy* (Figura 14, coluna 7 e 8). O tamanho do fragmento amplificado está de acordo com o esperado pela posição dos primers na sequência *waxy*. Porém, nestes genótipos foi observada a amplificação de um segundo fragmento *waxy* de aproximadamente 0.7kb, não esperado. Este fato pode ter ocorrido por pareamento indevido dos primers em regiões internas do gene ou do fragmento amplificado de 1.2kb. De duas sublinhagens Ast222wx analisadas neste experimento, uma não apresentou amplificação de sequências *waxy* (Figura 14, coluna 5), e na outra sublinhagem ocorreu amplificação de um fragmento de aproximadamente 0.8kb, tamanho menor que o esperado (Figura 14, coluna 6). Nos descendentes autofecundados desta progênie não se observou mais o fragmento amplificado. Os primers e as condições de amplificação utilizados nos experimentos de PCR foram os mesmos para os genótipos normais e mutantes. Como controle deste experimento foram utilizados os dois clones pcDNAWx e pWx5. Apenas o clone pWx5, que contém o DNA genômico, teve sua sequência *waxy* amplificada do tamanho esperado (resultados não apresentados). Nos experimentos de PCR com este clone também foi observada a amplificação de um segundo fragmento *waxy* de mesmo tamanho daquele observado no DNA genômico de milho, indicando a ocorrência de um problema técnico

nesses experimentos. A combinação de primers 2688 e 3874 não foi eficiente para amplificar a sequência waxy de alguns genótipos mutantes e do clone de cDNA waxy.

Em um outro experimento de amplificação do loco *Wx* foram utilizados os primers 2688/4384 e amostras de DNA das linhagens L477, L222, Ast-o2, W64 e Ast222 normal e waxy. Os resultados estão apresentados na Figura 15. Os fragmentos de 1.7kb observados nas colunas 1,2,3 (Figura 15a) correspondem à sequência waxy das linhagens L477, L222 e Ast-o2, respectivamente. Este tamanho de fragmento está de acordo com o esperado pela posição dos primers na sequência de DNA waxy. Neste experimento também observou-se a amplificação de um segundo fragmento waxy de aproximadamente 1kb, que provavelmente é resultante de pareamento indevido dos primers dentro do próprio gene ou da sequência amplificada. Nas colunas 4-8 (Figura 15a) foram colocadas as amostras de DNA de plantas Ast222wx submetidas à amplificação por PCR. Portanto, pode-se observar que novamente a sequência waxy dos genótipos mutantes não foi amplificada. A amplificação de fragmento waxy de 1.7kb continuou a ser observado nas várias progênes Ast222 normal (Figura 15b, colunas 1-9) e também na linhagem B37 (Figura 15b, coluna 10). Um segundo fragmento waxy também foi observado nas linhagens Ast222 normal e B37.

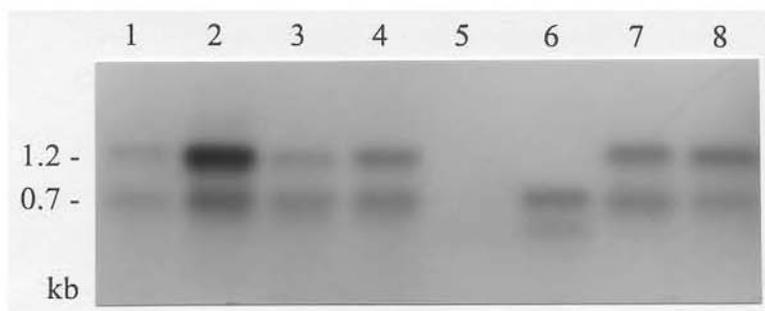


Figura 14- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA do loco *waxy* amplificadas por PCR com os primers 2688 e 3874 e hibridizadas com a sonda cDNA_{Wx}. Coluna 1 = L477wx; 2, 3 e 4 = Ast222 normal; 5 e 6 = Ast222wx; 7 e 8 = Ast222 semente normal com setor *waxy*.

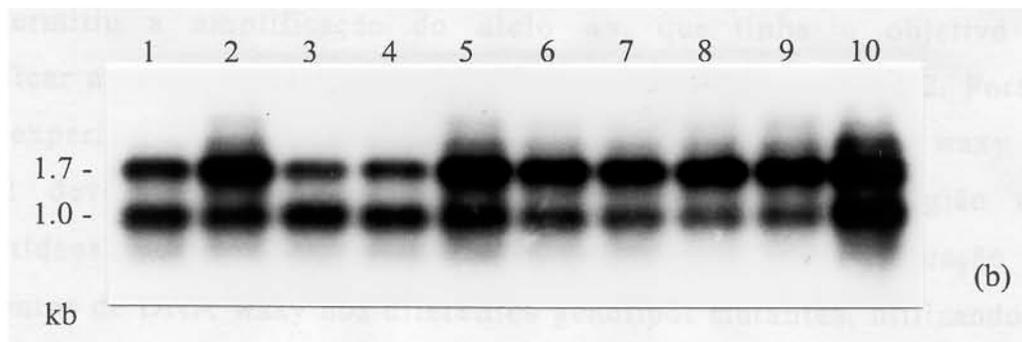
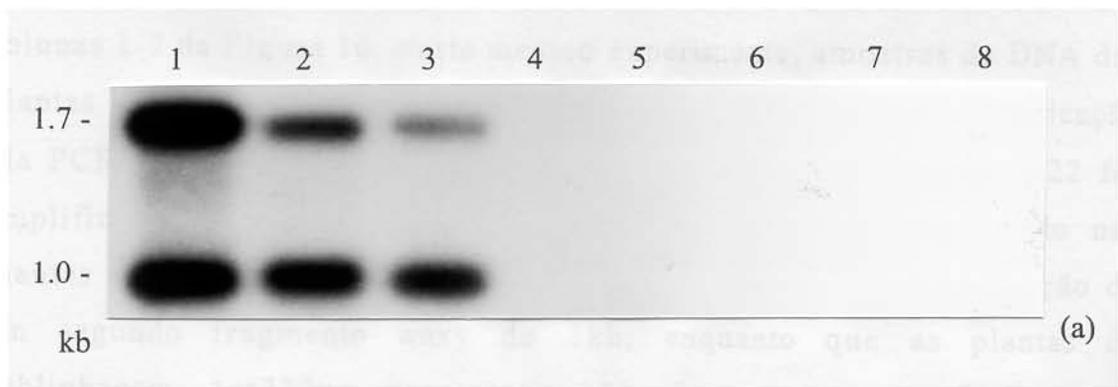


Figura 15- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA do loco *waxy* amplificadas por PCR com os primers 2688 e 4384, hibridizadas com a Sonda 2. **(a)** Coluna 1 = L477 normal; 2 = L222; 3 = Ast-o2; 4-8 = Ast222wx. **(b)** Colunas 1-9 = Ast222 normal; 10 = B37.

Utilizando-se os primers 2688/4384, foi realizado um experimento de amplificação de sequência waxy de DNA extraído de plantas F_1 (Ast222wx-P147 x L222), provenientes de sementes normais com muitos setores waxy. O DNA amplificado por PCR das plantas F_1 estão nas colunas 1-7 da Figura 16. Neste mesmo experimento, amostras de DNA das plantas Ast222wx-P147 e L222 também foram submetidas à amplificação via PCR (Figura 16, coluna 9). A sequência waxy da linhagem L222 foi amplificada em um fragmento de 1.7kb, que foi o mesmo obtido nas plantas F_1 (Figura 16, coluna 9). Novamente obteve-se a amplificação de um segundo fragmento waxy de 1kb, enquanto que as plantas da sublinhagem Ast222wx novamente não tiveram sua sequência waxy amplificadas (Figura 16, colunas 8, 10 e 11).

A metodologia de amplificação de sequências do loco *waxy* por PCR não permitiu a amplificação do alelo *wx*, que tinha o objetivo de identificar a causa da instabilidade genética da linhagem Ast222. Porém, estes experimentos indicaram que as sublinhagens mutantes waxy da Ast222 deveriam ter alterações na sequência waxy na região dos nucleotídeos 2688 a 4384, pois não foi observada amplificação de fragmentos de DNA waxy nos diferentes genótipos mutantes, utilizando-se as diversas combinações de primers. Um dos possíveis problemas técnicos para a não amplificação de sequências waxy no mutante poderia ser a degradação de DNA. Como controle, a qualidade do DNA para amplificação por PCR foi avaliada com a utilização de primers que amplificaram o gene da β -prolamina de milho nos vários genótipos Ast222wx (dados não apresentados). As linhagens Ast222 normal, L477, Ast-o2 e L222 parecem possuir a região dos nucleotídeos 2688 a 4384 semelhante à sequência waxy descrita na literatura. Os fragmentos amplificados nestes germoplasmas apresentaram os tamanhos esperados, de acordo com as posições dos primers na sequência de nucleotídeos da linhagem W22 (Klösgen *et al.*, 1986).

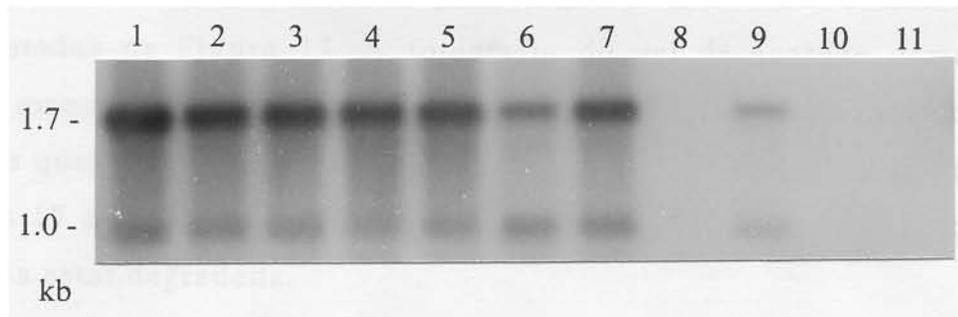


Figura 16- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA do loco *waxy* amplificadas por PCR com os primers 2688 e 4384, hibridizadas com a Sonda 2. Colunas 1-7 = F₁(Ast222wx x L222); 8 = Ast222wx-P147; 9 = L222; 10 e 11 = Ast222wx.

4.2.3- Análise da expressão de RNA pelo loco *waxy*

Dando continuidade à caracterização da instabilidade genética da linhagem Ast222, a expressão de mRNA *waxy* foi avaliada em northern blot. O objetivo deste experimento foi verificar se a síntese de mRNA *waxy* é alterada pela mutação da linhagem Ast222. Amostras de RNA total foram extraídas a partir de endosperma imaturo (20-22DAP) dos genótipos Ast-o2, L222, Ast222wx-P147 e F₂(Ast222wx-P147 x L222). As progênes F₂ eram provenientes de plantas germinadas a partir de sementes F₁ com alta frequência de instabilidade para o gene *waxy*. Os resultados estão apresentados na Figura 17. A fotografia do gel de agarose demonstrou existir amostras de RNA na membrana utilizada para o northern blot, pois grandes quantidades de RNA ribossômico 18S e 28S podem ser observadas (Figura 17 a, colunas 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 8). Apenas a amostra da coluna 5 aparenta estar degradada.

Não foi observado mRNA homólogo à sonda cDNA_{Wx} nas várias sublinhagens Ast222wx (Figura 17b, colunas 1, 2, 3). Este resultado sugere que este gene não foi transcrito no endosperma mutante ou que o RNA *waxy* foi degradado imediatamente após a síntese. Nas linhagens L222 e Ast-o2, e em duas plantas F₂ ocorreu a síntese de transcrito *Wx* (Figura 17b, colunas 8, 7, 4 e 6 respectivamente). Para assegurar que não ocorreu degradação dos mRNAs nos experimentos de northern blot, as mesmas membranas, que haviam sido hibridizadas com uma sonda cDNA_{Wx}, foram lavadas e re-hibridizadas com sonda de cDNA de zeína de 22kDa de milho, que também se expressa durante o desenvolvimento do endosperma (Figura 17c). Como pode ser observado na Figura 17c, o cDNA de zeína hibridizou com o RNA extraído das progênes Ast222wx (colunas 1-3). Este resultado demonstrou que a transcrição de zeína ocorreu nos genótipos testados e que as amostras de mRNA utilizadas nas colunas 1, 2 e 3 não estavam degradadas. Portanto, ficou assim comprovada a ausência de mRNA *waxy* nos mutantes.

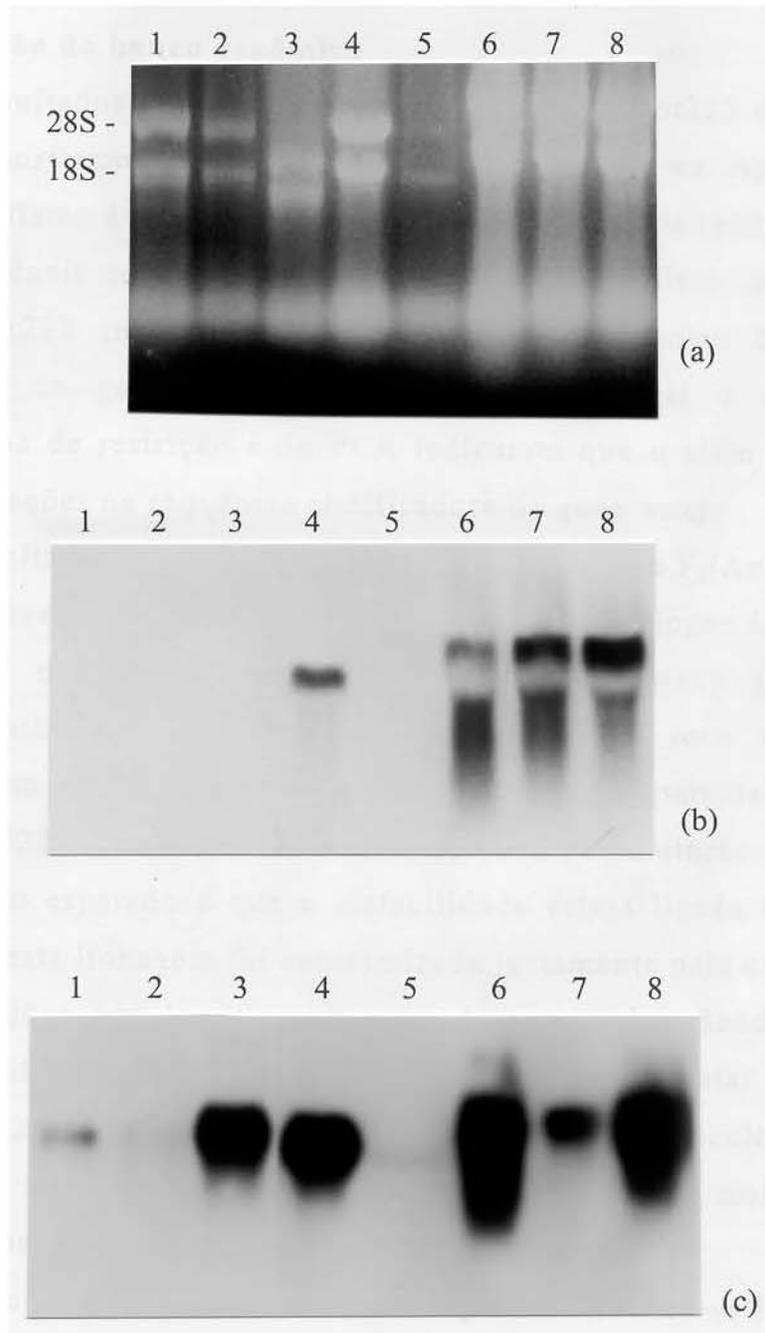


Figura 17- (a) Fotografia de gel de agarose contendo as amostras de RNA que foram transferidas para a membrana. Observar a presença de RNA ribossômico 18S e 28S. Colunas 1-3, 5 = Ast222wx; 4 e 6 = F_2 (Ast222wx-P147 x L222); 7 = Ast-o2; 8 = L222. (b) Autorradiograma da hibridização das amostras de RNA da figura 17a com a sonda cDNA Wx. (c) Autorradiograma da mesma membrana contendo RNA, hibridizada com a sonda de cDNA de zeína 22kDa.

4.3- Avaliação do banco genômico

Os resultados de Southern blot da linhagem Ast222 demonstraram existir polimorfismo de restrição entre os alelos *Wx* e *wx*. Aparentemente, este polimorfismo é resultante de alterações em sítios de restrição dentro e fora da sequência codificadora do gene *waxy*. Além disso, as análises de PCR da Ast222 indicaram existir polimorfismo dentro da sequência codificadora do gene *waxy* entre os alelos normal e mutante. Os polimorfismos de restrição e de PCR indicaram que o alelo mutante tem grandes alterações na sequência codificadora do gene *waxy*.

Os resultados de Southern blot das progênies F_1 e F_2 (Ast222wx-P147 x L222) instáveis mostraram que os fragmentos homólogos à sonda *waxy* apresentaram o mesmo tamanho dos fragmentos *waxy* presente nos parentais. Então, aparentemente a instabilidade do loco *waxy* estaria associada com os fragmentos já observados nos parentais. Como a linhagem L222 é estável e nunca apresentou mutação alguma no endosperma, o esperado é que a instabilidade esteja ligada à Ast222wx-P147, já que esta linhagem foi caracterizada justamente pela capacidade de induzir mutações nos locos *waxy* e *amylose-extender*. Sendo assim, as evidências indicam que a indução de mutações deve estar associada à progênie Ast222wx-P147. Então, este genótipo foi escolhido para a construção de um banco genômico visando a identificação molecular do(s) agente(s) causador(es) da instabilidade do loco *waxy*.

O banco genômico construído em fago λ utilizando-se DNA isolado da Ast222wx-P147 foi avaliado para a presença de recombinantes com sequências homólogas ao gene *waxy*. Foram avaliadas 29 placas de Petri de 150mm, cada uma com cerca de 40.000 fagos, perfazendo um total de 1.2×10^6 pfu. A seleção foi realizada com a sonda cDNA *Wx* marcada com P^{32} . A autorradiografia das membranas submetidas à hibridização revelou a presença de cinco possíveis recombinantes homólogos ao gene *waxy*. Estes

clones foram submetidos a mais duas etapas de seleção, confirmando que eles possuíam homologia com este gene.

O DNA de fago foi isolado dos cinco clones recombinantes para avaliação do fragmento clonado por Southern blot. A digestão dos cinco clones com as enzimas *EcoRI*, *XbaI*, *Sall* e *NotI* e posterior transferência para membrana e hibridização com a sonda cDNA W_x demonstrou que embora todos os cinco clones apresentassem fragmentos clonados, apenas um deles era homólogo ao gene *waxy* e foi denominado $\lambda wx-Ast222$. O fragmento de DNA clonado da sublinhagem Ast222wx-P147, com homologia ao gene *waxy*, possui aproximadamente 11.3kb. Este fragmento quando digerido com a endonuclease *Sall* gerou fragmentos de aproximadamente 3kb, 3.8kb e 4.5kb (Figura 18a, colunas 1, 3 e 2, respectivamente), que foram clonados no sítio *Sall* do vetor bluescript KS. Estes sub-clones foram denominados Sal2 (3kb), Sal3 (4.5kb) e Sal4 (3.8kb). Destes três clones, apenas o clone Sal4 não hibridiza com a sonda cDNA W_x (Figura 14b, coluna 3), enquanto que os clones Sal 2 e 3 possuem homologia com esta sonda (Figura 14b, coluna 1, 4, 5 (Sal2) e 2 (Sal3)).

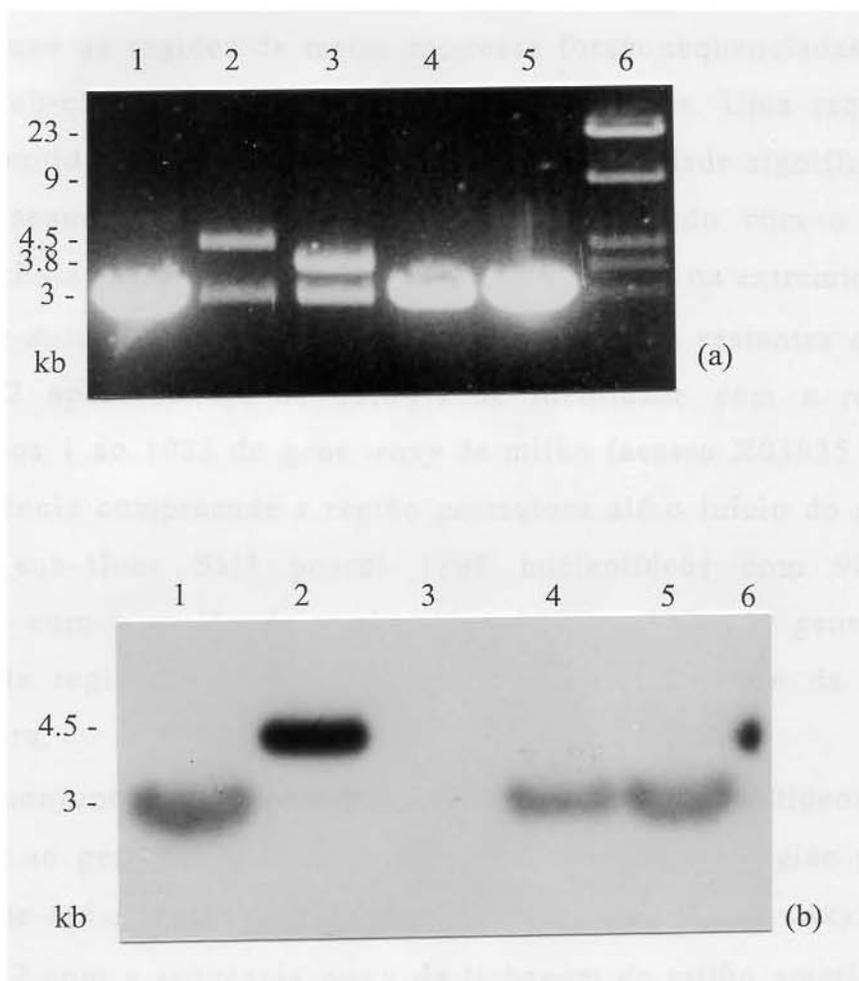


Figura 18- Sub-clonagem do inserto waxy presente no clone $\lambda wx-Ast222$. (a) Fragmentos do clone $\lambda wx-Ast222$ gerados pela restrição com a endonuclease *SalI*. Coluna 1, 4 e 5 = sub-clone Sal2; 2 = sub-clone Sal3; 3 = sub-clone Sal4; 6 = clone $\lambda wx-Ast222$ digerido com *SalI*. (b) Autorradiograma da hibridização do gel descrito em (a) com a sonda cDNA_{Wx}.

Os sub-clones Sal2, Sal3 e Sal4 foram inteiramente sequenciados. Este sequenciamento foi basicamente realizado em uma das fitas do DNA, enquanto que as regiões de maior interesse foram sequenciadas nas duas fitas. O sub-clone Sal2 possui 3046 pares de bases. Uma sequência de 2068 nucleotídeos deste clone não apresentou identidade significativa com nenhuma sequência descrita no GenBank, de acordo com o programa BLASTN. Esta sequência de 2068 nt está posicionada na extremidade 5' do clone *λwx-Ast222* (Figura 20). Os 978 nucleotídeos restantes deste sub-clone Sal2 apresentaram de 99,84% de identidade com a região dos nucleotídeos 1 ao 1033 do gene *waxy* de milho (acesso X03935 M24258). Esta sequência compreende a região promotora até o início do exon 1 do gene. O sub-clone Sal3 possui 1308 nucleotídeos com 98,85% de identidade com a região do nucleotídeo 1068 a 2376 do gene *waxy* de milho. Esta região corresponde ao exon 1 até o intron 6 da sequência codificadora.

No conjunto, o clone *λwx-Ast222* possui 2286 nucleotídeos com alta identidade ao gene *waxy*. Esta sequência corresponde à região promotora seguindo-se até o intron 6. O alinhamento da sequência *waxy* do clone *λwx-Ast222* com a sequência *waxy* da linhagem de milho americana W22 (Klösgen *et al.*, 1986) está apresentado na Figura 19 e foi realizado com o programa Clustal W (1.4). No alinhamento das sequências *waxy* podemos observar pequenas alterações de nucleotídeos (nt) na sequência da *Ast222wx* comparada com a sequência da linhagem W22. As alterações na sequência são devidas as deleções (1-4 nt), substituições ou adições (1-2 nt). Algumas das deleções estão localizadas em regiões de repetição e em potenciais sítios de ligação de fatores regulatórios do promotor do gene *waxy* (Figura 19, posição de 288-302, nt sublinhados). Outras deleções estão localizadas em regiões ricas em guanina e citosina da sequência codificadora. Regiões ricas em G-C comumente levam à formação de estruturas secundárias, dificultando o sequenciamento. Portanto, a

ausência de algumas bases em regiões com alto conteúdo de guanina e citosina pode ter sido ocasionada por erros de leitura do gel, gerados pela compressão de bandas. Exemplos destas alterações podem ser observados nos nucleotídeos 458, 813, 892 da Figura 19. A diferença entre as duas sequências *waxy* na posição 1034 a 1068 está na ausência de 35 nt no clone $\lambda wx-Ast222$. Esta região está compreendida entre dois sítios *Sall* (posição 1028 e 1068, nt em violeta, Figura 19). A endonuclease *Sall* foi utilizada na sub-clonagem de $\lambda wx-Ast222$, portanto, a ausência destes 35 nt pode estar relacionada com a perda deste pequeno fragmento na sub-clonagem. Nas regiões CAAT e TATA boxes não existem alterações de nucleotídeos entre as sequências *waxy* das linhagens *Ast222wx* e *W22*. As pequenas diferenças observadas no alinhamento das sequências *waxy* podem ser resultantes de polimorfismos normalmente encontrados entre diferentes linhagens endogâmicas de milho.

Os resultados de sequenciamento dos sub- clones *Sal2* e *Sal3* e a identidade com a sequência do gene *waxy* indicam que estes sub- clones são contíguos no clone de lambda. Existem 2286 nucleotídeos no clone $\lambda wx-Ast222$ com alta identidade ao gene *waxy*. Estes nucleotídeos compreendem a região promotora e os exons e introns de 1 a 6. O gene *waxy* possui 14 exons e 13 pequenos introns (Klösger *et al.*, 1986). Portanto, os resultados de sequenciamento demonstram a deleção de 8 exons e 7 introns do gene *waxy* no clone $\lambda wx-Ast222$.

Imediatamente após a terminação 3' da sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ foi identificada uma sequência de 1.9kb, que não possui identidade significativa em nível de nucleotídeos e de aminoácidos com qualquer sequência descrita no GenBank, através da análise com o programa BLAST (N e PX). Esta sequência compreende os nucleotídeos de 2279-4185 (Figura 19).

Ligada à sequência desconhecida de 1.9kb no clone *λwx-Ast222*, encontra-se uma sequência de aproximadamente 1.3kb (Figura 19, nt 4186-5560) apresentando 89,25% de identidade com o retroelemento ***PREM-2*** (EMBL,U41000). Esta mesma sequência também apresentou 60% de identidade com o retrotransposon ***Ji3*** (EMBL,U68405). A região com identidade ao ***PREM2*** corresponde à LTR5', ao PBS e ao início da região que contém o gene *gag*. A alta identidade da sequência do clone *λwx-Ast222* com o ***PREM2*** pode ser observada no alinhamento da Figura 19 (nt 4185-5560). A região U3 da LTR do ***PREM2*** deve estar dentro da região compreendida entre os nucleotídeos 11 e 420, pois neste intervalo existem dois putativos TATA boxes nas posições 301 e 406 (nt em verde na Figura 19). O alinhamento desta região U3 com o clone *λwx-Ast222* mostrou algumas alterações de nucleotídeos nesta região (Figura 19, nt 4227-4605). As alterações em nucleotídeos observadas entre estas duas sequências são deleções (nts 4356 e 4446), adições (nt 4384 e 4416) ou substituições (nt 4320, 4519 e outras posições). Uma destas substituições ocorreu no segundo putativo TATA boxe do ***PREM2*** (nt 4601). Portanto, existem diferenças na sequência de nucleotídeos do clone *λwx-Ast222*, quando comparada com a região U3 da LTR5' do ***PREM2***. A região R do ***PREM2*** deve estar localizada entre os nucleotídeos 421 e 1160, pois os sítios de poliadenilação estão nas posições 739 e 1154 (Figura 19, nt em turquesa). Nesta região existem pequenas alterações entre o clone *λwx-Ast222* e a sequência do ***PREM2***, em geral decorrentes de substituições de nucleotídeos. Entretanto, estas alterações são pouco frequentes, envolvendo apenas 1-2 nucleotídeos. Portanto, o alinhamento demonstrou existir uma maior identidade na região R do que na região U3 entre as sequências do ***PREM2*** e do clone *λwx-Ast222*. O alinhamento da região U5 do ***PREM2*** com a sequência do clone *λwx-Ast222* está bem semelhante ao alinhamento da região R. Estes resultados permitem sugerir que a região

U3 apresenta mais alterações do que as regiões R e U5, comparando-se a LTR5' do **PREM2** com o clone $\lambda wx-Ast222$. O sítio de ligação de primer (PBS) do **PREM2** é complementar à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina e localiza-se nos nucleotídeos 3193-3205 (Figura 19, nt em petróleo). Na comparação da sequência de nucleotídeos do PBS do **PREM2** com o clone $\lambda wx-Ast222$ foi observada uma única troca do nucleotídeo G por A na posição nt 1323 (Figura 19). Finalizando a região do clone $\lambda wx-Ast222$ similar ao retrotransposon **PREM2**, encontra-se a região inicial do gene *gag* (Figura 19, posição 1361, nt em verde). Esta região apresentou-se idêntica à sequência correspondente no retrotransposon **PREM2**.

No clone $\lambda wx-Ast222$, logo após a sequência de nucleotídeos que apresentou identidade com o **PREM2**, existem aproximadamente 3.8kb (nt 5563-9331). Estes nucleotídeos estão no sub-clone Sal4. A pesquisa por identidade com o programa BLASTN, no GenBank, demonstrou que esta região do clone $\lambda wx-Ast222$ não possui identidade significativa com nenhuma sequência descrita neste banco de dados. No entanto, usando-se o programa BLASTPX foi encontrado que esta sequência possui alguma similaridade em nível de aminoácidos com poliproteínas de diversos retrotransposons. A identidade de nucleotídeos entre as sequências provavelmente não foi encontrada porque as sequências nucleotídicas das poliproteínas dos retrotransposons são muito variadas. A tradução da sequência do nucleotídeo 5563 ao 9331 apresentou algumas regiões com a similaridade variando de 31-45% com as poliproteínas dos retrotransposons **Tal** de *Arabidopsis* e com o **Tnt1** de tabaco. Nesta região também foi observada similaridade com o retrotransposon do tipo *copia* de *Drosophila*.

Figura 19 - Alinhamento da sequência parcial do clone $\lambda wx-Ast222$ (λwx) iniciando-se com a sequência *waxy* X03935 M24258, da linhagem de milho W22 (Klõesgen *et al.*, 1986), e com a LTR 5' do retrotransposon PREM-2. Asteriscos (*) representam nucleotídeos iguais. O final da sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ está representado em azul escuro na posição 2276. As potenciais regiões regulatórias do gene *waxy* estão destacadas pelos nucleotídeos sublinhados. Os CAAT e TATA boxes, respectivamente, estão representados pelos nucleotídeos em verde. Os nucleotídeos em violeta representam o sítio de reconhecimento da endonuclease *SalI*. O ATG inicial da proteína glicosil transferase está destacado com os nucleotídeos em rosa. Os nucleotídeos canônicos de início da LTR estão destacados em azul. Os sítios de poliadenilação da região R estão destacados em turquesa. O PBS está destacado com os nucleotídeos na cor petróleo. O início da região do gene *gag* está destacado com os nucleotídeos em verde escuro. A região compreendida entre os nucleotídeos 2277 e 4184 não apresentou similaridade com as sequências existentes no GenBank. Na região compreendida entre os nucleotídeos 5408 e 9230 foi encontrada similaridade de aminoácidos, com as poliproteínas dos retrotransposons *Tal* e *Tnt1*.

λwx	1	CAGCGACCTA	TTACACAGCC	CGCTCGGGCC	CGCGACGTCG	GGACACATCT	TCTTCCCCCT
<i>waxy</i>	1	CAGCGACCTA	TTACACAGCC	CGCTCGGGCC	CGCGACGTCG	GGACACATCT	TCTTCCCCCT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	61	TTTGGTGAAG	CTCTGCTCGC	AGCTGTCCGG	CTGCTTGGAC	GTTCTGTGGG	CAGATTTCATC
<i>waxy</i>	61	TTTGGTGAAG	CTCTGCTCGC	AGCTGTCCGG	CTCCTTGGAC	GTTCTGTGGG	CAGATTTCATC
		*****	*****	*****	** *****	*****	*****
λwx	121	TGTCGTCTCG	TCTCCTGTGC	TTCCTGGGTA	GCTTGTGCAG	TGGAGCTGAC	ATGGTCTGAG
<i>waxy</i>	121	TGTCGTCTCG	TCTCCTGTGC	TTCCTGGGTA	GCTTGTGTAG	TGGAGCTGAC	ATGGTCTGAG
		** *****	*****	*****	***** **	*****	*****
λwx	181	CAGGCTTAAA	ATTTGCTCGT	AGACGAGGAG	TACCAGCACA	GCACGTTGCG	GATTTCTCTG
<i>waxy</i>	181	CAGGCTTAAA	ATTTGCTCGT	AGACGAGGAG	TACCAGCACA	GCACGTTGCG	GATTTCTCTG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	241	CCTGTGAAGT	GCAACGTCTA	GGATTGTCAC	ACGCCTTGGT	CGCGTCG---	-----
<i>waxy</i>	241	CCTGTGAAGT	GCAACGTCTA	GGATTGTCAC	ACGCCTTGGT	CGCGTCGCGT	CGCGTCGCGT
		*****	*****	*****	*****	*****	
λwx	288	--ATGCGGTG	GTGAGCAGAG	CAGCAACAGC	TGGGCGGCCC	AAAGTTGGCT	TCCGTGTCTT
<i>waxy</i>	301	CGATGCGGTG	GTGAGCAGAG	CAGCAACAGC	TGGGCGGCCC	AACGTTGGCT	TCCGTGTCTT
		*****	*****	*****	*****	** *****	*****
λwx	346	CGTCGTACGT	ACGCGCGCGC	CGGGGACACG	CAG---AGAG	CGGAGAGCGA	GCCGTGCACG
<i>waxy</i>	361	CGTCGTACGT	ACGCGCGCGC	CGGGGACACG	CAGCAGAGAG	CGGAGAGCGA	GCCGTGCACG
		*****	*****	*****	*** ****	*****	*****
λwx	403	GGGAGGTGGT	GTGCAAGTGC	AGCCGCGCGC	CCGGCCGC--	--GCCCGGTG	GGCAACCCAA
<i>waxy</i>	421	GGGAGGTGGT	GTGSAAGTGG	AGCCGCGCGC	CCGGCCGCCC	GCCCGCGGTG	GGCAACCCAA
		*****	*** *****	*****	*****	*****	*****

λwx	459	AAGTACCCAC	GACAAGCGAA	GGCGCCAAAG	C-ATCCAAGC	TCCGGAACGC	A-----
waxy	481	<u>AAGTACCCAC</u>	<u>GACAAGCGAA</u>	<u>GGCGCCAAAG</u>	<u>CGATCCAAGC</u>	<u>TCCGGAACGC</u>	<u>AAGAGCATGC</u>
		*****	*****	*****	* *****	*****	*
λwx	509	-----	----TCAGCC	ACAAGCAGCC	GAGAACCAGAA	CCGGTGGGCG	ACGCGTCGTG
waxy	541	<u>GTCGGCTCGG</u>	<u>AGAGCCAGCC</u>	<u>ACAAGCAGCC</u>	<u>GAGAACCAGAA</u>	<u>CCGGTGGGCG</u>	<u>ACGCGTCGTG</u>
			*****	*****	*****	*****	***** **
λwx	555	GGACGGACGC	GG-CGACGCT	TCCAAACGGG	CCACGTACTC	CGGCGTGTGC	GTGCGTGCAG
waxy	601	<u>GGACGGACGC</u>	<u>GGCGGACGCT</u>	<u>TCCAAACGGG</u>	<u>CCACGTACTC</u>	<u>CGGCGTGTGC</u>	<u>GTGCGTGCAG</u>
		*****	** *****	*****	***** *	*****	*****
λwx	614	ACGACAAGCC	AAGGCGAGGC	AGCCCCGAT	CGGGAAAGCG	T'TTTGGGCGC	GAGCGCTGGC
waxy	661	<u>ACGACAAGCC</u>	<u>AAGGCGAGGC</u>	<u>AGCCCCGAT</u>	<u>CGGGAAAGCG</u>	<u>T'TTTGGGCGC</u>	<u>GAGCGCTGGC</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	674	GTGCGGGTCA	GTCGCTGGTG	CGCAGTGCCG	GGGGGAACGG	GTATCGTGGG	GGGCGCGGGC
waxy	721	<u>GTGCGGGTCA</u>	<u>GTCGCTGGTG</u>	<u>CGCAGTGCCG</u>	<u>GGGGGAACGG</u>	<u>GTATCGTGGG</u>	<u>GGGCGCGGGC</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	734	GGAGGAGAGC	GTGGCGAGGG	CCGAGAGCAG	CGCCG---CG	GGTCACGCAA	-GCGCCCCAC
waxy	781	<u>GGAGGAGAGC</u>	<u>GTGGCGAGGG</u>	<u>CCGAGAGCAG</u>	<u>CGCCGCGCCG</u>	<u>GGTCACGCAA</u>	<u>GCGCCCCAC</u>
		*****	*****	*****	*** **	*****	*****
λwx	790	GTA CTGCCCT	CCCCCTCCGC	GCGCGCTAGA	AATACCGAGG	CCTGGACCGG	GGCC---CCC
waxy	841	<u>GTA CTGCCCT</u>	<u>CCCCCTCCGC</u>	<u>GCGCGCTAGA</u>	<u>AATACCGAGG</u>	<u>CCTGGACCGG</u>	<u>GGCGGGGCC</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	** **
λwx	847	CGTCACATCC	ATCCATCGAC	CGATCGATCG	CCACAGCCAA	CACCACCCGC	CGAGGCGACG
waxy	901	<u>CGTCACATCC</u>	<u>ATCCATCGAC</u>	<u>CGATCGATCG</u>	<u>CCACAGCCAA</u>	<u>CACCACCCGC</u>	<u>CGAGGCGACG</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	907	CGACAGCCGC	CAGGAGGAAG	GAATAAACTC	ACTGCCAGCC	AGTGAAGGGG	GAGAAGTGTA
waxy	961	<u>CGACAGCCGC</u>	<u>CAGGAGGAAG</u>	<u>GAATAAACTC</u>	<u>ACTGCCAGCC</u>	<u>AGTGAAGGGG</u>	<u>GAGAAGTGTA</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	967	CTGCTCCGTC	GAC-----	-----	-----	-----GT	CGACGACCAG
waxy	1021	<u>CTGCTCCGTC</u>	<u>GACCCAGTGG</u>	<u>CGCACGGCCG</u>	<u>GGCACGGGCTG</u>	<u>CTCATCTCGT</u>	<u>CGACGACCAG</u>
		*****	***			**	*****
λwx	991	GTTCTGTTCC	GTTCCGATCC	GATCCGATCC	TGTCC'TTGAG	T'TTCGTCCAG	ATCCTGGCGC
waxy	1081	<u>GTTCTGTTCC</u>	<u>GTTCCGATCC</u>	<u>GATCCGATCC</u>	<u>TGTCC'TTGAG</u>	<u>T'TTCGTCCAG</u>	<u>ATCCTGGCGC</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1051	GTA TCTGCGT	GTTTGATGAT	CCAGGTTCTT	CGAACCTAAA	TCTGTCCGTG	CACACGTCTT
waxy	1141	<u>GTA TCTGCGT</u>	<u>GTTTGATGAT</u>	<u>CCAGGTTCTT</u>	<u>CGAACCTAAA</u>	<u>TCTGTCCGTG</u>	<u>CACACGTCTT</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1111	T'TCTCTCTCT	CCTACGCAGT	GGATTAATCG	GCATGGCGGC	TCTGGCCACG	TCGCAGCTCG
waxy	1201	<u>T'TCTCTCTCT</u>	<u>CCTACGCAGT</u>	<u>GGATTAATCG</u>	<u>GCATGGCGGC</u>	<u>TCTGGCCACG</u>	<u>TCGCAGCTCG</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1171	TCGCAACGCG	C--CGGCC TG	GGCGTCCC GG	ACGCGTCCAC	GTTCGCGCGC	GGC--CGCGC
waxy	1261	<u>TCGCAACGCG</u>	<u>CGCCGGCC TG</u>	<u>GGCGTCCC GG</u>	<u>ACGCGTCCAC</u>	<u>GTTCGCGCGC</u>	<u>GGC--CGCGC</u>
		*****	* *****	*****	*****	*****	***

λwx	1227	AGGGCCTGAG	GGGGGCCCGG	GCGTCGGCGG	CGGC GGACAC	GCTCAGCATG	CGGACCAGCG
waxy	1321	AGGGCCTGAG	GGGGGCCCGG	GCGTCGGCGG	CGGC GGACAC	GCTCAGCATG	CGGACCAGCG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1287	CGCG----GC	GCCCAGGCAC	CAGCAGCAGG	CGCGCCGCGG	GGGCAGGTTC	CCGTCGCTCG
waxy	1701	CGCGCCCGGG	GCCCAGGCAC	CAGCAGCAGG	CGCGCCGCGG	GGGCAGGTTC	CCGTCGCTCG
		**** **	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1343	TCGTGTGCGC	CAGCGCCGGC	ATGAACGTCG	TCTTCGTCGG	CGCCGAGATG	GCGCCGTGGA
waxy	1441	TCGTGTGCGC	CAGCGCCGGC	ATGAACGTCG	TCTTCGTCGG	CGCCGAGATG	GCGCCGTGGA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1403	GCAAGACCGG	CGGCCTCGGC	GACGTCCTCG	GCGGCCTGCC	GCCGGCCATG	GCCGTAAGCG
waxy	1501	GCAAGACCGG	CGGCCTCGGC	GACGTCCTCG	GCGGCCTGCC	GCCGGCCATG	GCCGTAAGCG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1463	CGCGCACCGA	GACATGCATC	CGTTGGATCG	CGTCTTCTTC	GTGCTCTTGC	CGCGTGCATG
waxy	1561	CGCGCACCGA	GACATGCATC	CGTTGGATCG	CGTCTTCTTC	GTGCTCTTGC	CGCGTGCATG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1523	ATGCATGTGT	TTCCTCCTGG	CTTGTGTTTC	TGTATGTTGA	CGTGTTTGTT	CGGGCATGCA
waxy	1621	ATGCATGTGT	TTCCTCCTGG	CTTGTGTTTC	TGTATGT-GA	CGTGTTTGTT	CGGGCATGCA
		*****	*****	*****	***** **	*****	*****
λwx	1583	TGCAGGCGAA	CGGGCACCCT	GTCATGGTTC	TCTCTCCCCG	CTACGACCAG	TACAAGGACG
waxy	1880	TGCAGGCGAA	CGGGCACCCT	GTCATGGTTC	TCTCTCCCCG	CTACGACCAG	TACAAGGACG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1643	CCTGGGACAC	CAGCGTCGTG	TCCGAGGTAC	GGCCACCAG	ACCAGATTCA	GATCACAGTC
waxy	1740	CCTGGGACAC	CAGCGTCGTG	TCCGAGGTAC	GGCCACCAG	ACCAGATTCA	GATCACAGTC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1703	ACACACACCG	TCATATGAAC	CTTTCTCTGC	TCTGATGCC	GCAACTGCAA	ATGCATGCAG
waxy	1800	ACACACACCG	TCATATGAAC	CTTTCTCTGC	TCTGATGCC	GCAACTGCAA	ATGCATGCAG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1763	ATCAAGATGG	GAGACGGGTA	CGAGACGGTC	AGGTTCTTCC	ACTGCTACAA	GCGCGGAGTG
waxy	1860	ATCAAGATGG	GAGACGGGTA	CGAGACGGTC	AGGTTCTTCC	ACTGCTACAA	GCGCGGAGTG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1823	GACCGCGTGT	TCGTTGACCA	CCCAGTGTTC	CTGGAGAGGG	TGAGACGAGA	TCTGATCACT
waxy	1920	GACCGCGTGT	TCGTTGACCA	CCCAGTGTTC	CTGGAGAGGG	TGAGACGAGA	TCTGATCACT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1883	CGATACGCAA	TTACCACCCC	ATTGTAAGCA	GTTACAGTGA	GCTTTTTTTC	CCCCCGGCCT
waxy	1980	CGATACGCAA	TTACCACCCC	ATTGTAAGCA	GTTACAGTGA	GCTTTTTTTC	CCCCCGGCCT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
λwx	1943	GGTCGCTGGT	TTCAGGTTTG	GGGAAAGACC	GAGGAGAAGA	TCTACGGGCC	TGTCGCTGGA
waxy	2040	GGTCGCTGGT	TTCAGGTTTG	GGGAAAGACC	GAGGAGAAGA	TCTACGGGCC	TGTCGCTGGA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****

<i>λwx</i>	2003	ACGGACTACA	GGGACAACCA	GCTGCGGTTT	AGCCTGCTAT	GCCAGGTCAG	GATGGCTTGC
<i>waxy</i>	2100	ACGGACTACA	GGGACAACCA	GCTGCGGTTT	AGCCTGCTAT	GCCAGGTCAG	GATGGCTTGC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
<i>λwx</i>	2063	TACTACAAC	TCAGATCATC	TGTATGCAGC	AGTATACACC	GATGAGAAAT	GCATGCTGTT
<i>waxy</i>	2160	TACTACAAC	TCATATCATC	TGTATGCAGC	AGTATACACC	GATGAGAAAT	GCATGCTGTT
		*****	*** *****	*****	*****	*****	*****
<i>λwx</i>	2123	CTGCAGGCAG	CACTTGAAGC	TCCAAGGATC	CTGAGCCTCA	ACAACAACCC	ATACTTCTCC
<i>waxy</i>	2220	CTGCAGGCAG	CACTTGAAGC	TCCAAGGATC	CTGAGCCTCA	ACAACAACCC	ATACTTCTCC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
<i>λwx</i>	2183	GGACCATACG	GTAAGAGTTG	CAGTCTTCGT	ATATAT--CT	GTTGAGCTCG	ACAATCTTCA
<i>waxy</i>	2280	GGACCATACG	GTAAGAGTTG	CAGTCTTCGT	ATATATATCT	GTTGAGCTCG	ACAATCTTCA
		*****	*****	*****	***** **	*****	* *****
<i>λwx</i>	2241	CAGGAAACGG	CCCATCAGAC	GGACTGTCAT	TTTACACAAT	CTTCACAGGA	TACCATACAA
<i>waxy</i>	2340	CAGGAAACGG	CCCATCAGAC	GGACTGTCAT	TTTACACTCA	CTACTGCTGC	TGCTCTTCTT
		***** **	*****	*****	*****	** * *	* * * *
<i>λwx</i>	2301	TTGAAAGGAT	GTAGATGGCT	AGCGGGGATA	AATACCCTAT	AATTTTTTTT	ACAAACCACA
	2361	AACAATAGAG	CAAATTGATT	AGTATGTATT	GAAACCCCAA	GAACACTAC	TTTCTCTAGC
	2421	ATTAAGGTTT	CCTTTGGCAG	GGCTATCTAG	ACAGCTCCTC	CTCTGGCTCT	TCGTGAAGCC
	2481	GTGTCAAATG	GTCTTAAAAA	ATGGCTCCTC	ATCGAGAGCC	ATCAAGGAGC	TAGATTTGTT
	2540	TTGCTATCGG	GAGATGAAGC	ATCAGAAAAC	AAGCTTCTAC	TGGTTTTTTC	TATCCACAC
	2601	ACAATAATAT	TTCACAAAGT	TACAGTCCCT	ATCATAGTTT	TCCCGTGAAA	AATCGTTTTA
	2661	CCAAATGAAT	TGCAAAACGG	CGCTGACTCC	TCTAGAGAAG	CCAGAAGAGC	CGAACCCGTT
	2731	TTGAGAAATA	TCGAAGCCAT	ACCAAAGGGG	GCCTAATPCA	TCCAAGCAAG	CCTCCTACAC
	2791	AAGTCTAGTA	GTTTAGTCTT	AATTTTGTAT	CACTCAAACA	AACAAGCTAC	AACTAGCTAA
	2851	ATTTACCAAT	AAAAACCACT	ACAAACTATT	TACAACACTAC	CTAAAAGTAC	TTTAGTTGGT
	2911	CTCCTGCTCA	TCGTGTGAGC	ATGGTTACGG	AGTTTGGCTT	CTATACACGG	CTCCTAATAT
	2971	TACCTTACGT	GCTTCGTCGC	GACATCTAGC	TGCTATGAGG	CCATTCATCC	TCCAATAATT
	3031	AGTTATTTGAC	GGACTTATCT	CTACTACTAT	AAAACATCAT	TATCAATAGT	CGTTCTGTAT
	3091	CACACACAAA	GTGGTAGGTC	TATCCTATCC	CTTTACCATT	GGGTCGTTAT	ACTATAGGTA
	3151	GGCCACGAAA	ATCACTCAAG	TCTCTGTTAG	TGGGTTGTTA	CTCTACAAAT	AGGTCGTGGG
	3211	AAACCAGCTA	AACCAAACAC	GACACGAAGC	CGAACGTGGC	ACAATACTCC	CATATAGTAA
	3271	CACCTTGCTA	GCTAAAAATAG	AACGAGGAGC	CGAACGAACT	AGAAAAAAGG	AGGCCAGACT
	3331	TATTTTCCAA	CTCATATGTT	TCTAGTTCTT	TAGGCTAAGA	TAAAGTAAA	TATTTTATTT
	3391	TTGTGTAACA	TTGCAATGCA	CGTAGGGTAG	TAATGGACTA	TAAATCTAC	ACTATAAAAA
	3451	TTAAGGACCA	AATTAGTTTC	CAGACTCTAT	TCCTATTAAT	TTTTGAAATA	AATATATTA
	3511	AGGACCCATA	CTTATTTGTA	ATGGATCGTG	ATCCATTACC	ACCTCTAAAC	ACATGCATAA
	3571	TACTAGTTGA	ATCCTATAAA	CGGGTACTGA	TCCAATTGTG	AATATCGTAA	CGAGATCGGT
	3631	CGTACAGACA	ATATGTGAGC	CAAACCTCTG	CTAGGGTTGA	CTGGTGATGA	GTTTTCTGAG
	3691	ATAGTTGTTT	CTAGGGATGG	CAATTTAATC	CGTGGATTTG	GATATCCGTC	GGATATCCGA
	3751	CTTGATGGAT	AAGGATATGG	ATATGTTTTT	GACCCGCGGG	TTAGATCAGT	ATTCGATCCG
	3811	AGATAAATTA	GGCATGGATT	TGGATATTTA	ATCTCACCCG	CGGGTAAATCC	GTTGGATATC
	3871	CGAAATTAAC	CATTAGTCCA	TTATTGCCAG	GATGAACATG	ATTCTACTAT	TATTGACTAA
	3931	AAAAATCAAA	CACAGCTACT	ATAGCGCTCA	GTCAAGTGCT	CAACACTACA	CTCGGATCGG
	4031	ATCAATATTG	ATTGTCATGT	ATTTGTTTTT	ATGCTGAGAC	ATGTAGACAT	GTAATTTTGT
	4091	CATGTCGAGA	ATGTTGCTTG	TTGAAAGACA	TGTATATTTG	TTTAATTTTT	TTATTAATAA
<i>λwx</i>	4151	TTAAGTTGTG	TATGATGTTG	AATTTGGGAA	AAACTTGAAA	GGGAATTAGG	CTTACACCTA
<i>PREM2</i>	5				TTGAAA	GGGAATTAGG	CTTACACCTA
					*****	*****	*****

λwx	4211	GTTCCCTAAAT	AATTTTTCGGT	GATTGAATTG	CCCAACACAA	ATCTTTGGAC	TAAGTAGTTT
PREM2	31	GTTCCCTAAAT	AATTTT-GGT	GGTTGAATTG	CCCAACACAA	ATCTTTGGAC	TAAGTAGTTT
		*****	***** *	* *****	*****	*****	*****
λwx	4271	GCCCAAGTGT	ATAGATTATA	CAGGTGTAAA	AGGTTACACAC	TCAGCCAATA	AAAAGACCAA
PREM2	90	GCCCAAGTGT	ATAGATTATA	CAGGTGTATA	AGGTTACACAC	TCAGCCAATT	AAAAGACCAA
		*****	*****	***** **	*****	*****	*****
λwx	4331	GTTTTGGATT	CAATAAAGGA	GCAAA-GGGG	CAACCGAAGG	CACCCCTGGT	CTGGCGCACC
PREM2	150	GTTTTGGATT	CAACAAAGGA	GCAAAAGGGG	CAACCGAAGG	CACCCCTGGT	CTGG--CACC
		*****	*** *****	***** ****	*****	*****	**** *
λwx	4390	GGACTGTCCG	GTGTGCCACC	GGACAGTGAA	CAGTACCTGT	CCGGTGCACC	AGGGG-ACTC
PREM2	208	GGACTGTCCG	GTGCGCCACC	GGACA-----	-----TGT	CCGGTGCACC	AGGGGGACTC
		*****	*** *****	*****	***	*****	***** ****
λwx	4449	AGACTCAAAC	TCTTCACTCT	CGGGATTCT	CGGAAGCCGG	CGCGCTATAA	TTCACCGGAC
PREM2	256	AGACTCAAAC	TCACCACCTT	CGGGAATTCA	CAGGGTGCAC	TCGGCTATAA	TTCACCGGAC
		*****	** *** *	***** **	* * *	*****	*****
λwx	4509	TGTCCGGTGT	GCACCGGACA	TGTCCGGTGC	TCCAAGGAAG	CGCGGTCTCC	GGAACTCGCC
PREM2	316	TGTCCGGTGT	ACACCGGACA	GTGTCCGTGC	GCCAAGGGAG	GTCGGCCTCA	GGAACTCGCC
		*****	*****	*****	***** **	** ***	*****
λwx	4569	AGCCTCAGGT	TCGCGTGGCA	GCCGCTCCGC	TAAATTCAC	CGGACTGTCC	GGTGTGCACC
PREM2	376	AGCTTCGGGA	AAAGCCAACG	GCTCGTGCAC	TATAATTCAC	CGGACTGTCC	GGTGTGCACC
		*** ** *	* *	** * * *	** *****	*****	*****
λwx	4629	GGACTGTCCG	GTGTACCAGC	GGAGCAACGG	CTCTTTTCGG	CGCCAACGGC	TCCCTGCGGT
PREM2	436	GGACTGTCCG	GTGCGACTCC	GGAGCAACGG	-TCATCTCCG	CGCCAACGGC	TCTCTGCCGC
		*****	*** * **	*****	** * ****	*****	** **** *
λwx	4689	GCATTTAATG	CGCGCACAAAC	GCGCGCAGAC	GTCAGACATG	CCCATACCGG	TGCACCGGAC
PREM2	495	GCATTTAATG	CGCTCT--GC	GCGTGCAGGA	GTCAGAATCG	CCCATGCTAG	CACACCGGAC
		*****	*** * *	*****	***** *	***** * *	*****
λwx	4749	ATCAAACAGT	ACATGTCGG-	--TGCACCGG	ACACCCAGGA	GGGCCACAA	GTCAGAAGCT
PREM2	553	ATCAAACAGT	ACCTGTCCGG	TGTGCACCGG	ACACCCAGGC	GGGCCACAA	GTCAGAAGCT
		*****	** **** *	*****	*****	*****	*****
λwx	4806	CCAACGGTCA	GAATCCAACG	GCAGTGATGA	CGTGGCAGGG	CG-ACCGGAC	TGTCCCG---
PREM2	613	CCAACGGTCA	GAATCCAACG	GCAGTGATGA	CGTGGCAGGG	GGCACCGGAC	TGTCCGGTGT
		*****	*****	*****	*****	* *****	***** *
λwx	4862	-----GGACT	GTCCGGTTCG	C-ATCGAGCA	GACGCCTCCA	GCCAACGGTC	AAGTTTG-TG
PREM2	673	GCACCGGACT	GTCCGGTTCG	CCATCGAACA	GACAGCCTC-	-CCAACGGCC	ACATTTGGTG
		*****	*****	* *****	*** * *	***** *	* **** **
λwx	4915	GTTGGGGCTA	TAAATACCCC	AACCACCCCA	CCATTCATTG	CATCCAAGTT	TTC-CACTTC
PREM2	731	GTTGGGGCTA	TAAATACCCC	AACCACCCCA	CCATTCATTG	CATCCAAGTT	TTCTCACTTC
		*****	*****	*****	*****	*****	*** *****

```

λwx 4974 TCAACTACT- ACAAGAGCTA GGCATTCAAT TCTAGACACA TTCAAAGAGA TCAAATCCTC
PREM2 791 TCAACCACITF ACAAGAGCTA GGCATTCAAT TCTAGACACA TTCAAAGAGA TCAAATCCTC
*****
λwx 5033 TCCAATFCCA CACAAAGCCC TAGTGACTAG TGAGAGTGAT TTGCCGTGTT CATTGAGCT
PREM2 851 TCCAATFCCA CACAAAACCC TAGTGACTAG TGAGAGTGAT TTGCCGTGTT CATTGAGCT
*****
λwx 5093 CTTGCGCTTG GATTGCTTCT TTTCTTTCTC ACTTGTTCTT GAGATCACAA CTCCATTGTA
PREM2 911 CTTGFGCTTG GATTGCTTCT TTTCTTTCTC ACTTGTTCTT GTGATCAAAA CTCCATTGTA
**** *****
λwx 5153 ATCAAGGCAA GAGGCACCAA TTGTGTGGTG GCCCTTGCG GGAAGTTTT GTTCCCGGCTT
PREM2 971 ATCAAGGCAA GAGGCACCAA TTGTGTGGTG GCCCTTGCG GGAAGTTTT GTTCCCGGCTT
*****
λwx 5213 TGATTTGAGA AGAGAAGCTC ACTCGGTCCG AGGGACCGTT TGAGAGAGGG AAGGGTTGAA
PREM2 1031 TGATTTGAGA AGAGAAGCTC ACTCGGTCCG AGTGACCGTT TGAGAGAGGG AAGGGTTGAA
*****
λwx 5273 AGAGACCCGG CCTTTGTGGC CTCCTCAACG GGGAGTAGGT TTGCAAAAAC CGAACCTCGG
PREM2 1091 AGAGACCCGG CCTTTGTGGC CTCCTCAACG GGGAGTAGGT TTGAGAGAAC CGAACCTCGG
*****
λwx 5333 TAAAACAAAT CTTCGTGTCT CACTTGCTTA TTCGCTGGG ATTTGTTTTG CGCTCTCTCT
PREM2 1151 TAAAACAAAT CCGTGTGTCA CACTTCATTA TTTGCTCGCG ATTTGTTTTG CGCCCTCTCT
*****
λwx 5393 CTCGGACTCG TTTATATTTT TAACGCTAAC CCGGCTTGTA GTTGTGTTTA TATTTGTAAA
PREM2 1211 CGCGGACTCG TTTATATTTT TAACACTAAC CCGGCTTGTA GTTGTGTTTA TATTTGTAAA
* *****
λwx 5453 TTTCAGTTTC GCCCTATTCA CCCCCCCCC CTCTAGGCGA CTATGAATTG GTATCAAAGC
PREM2 1271 TTTCAGTTTC GCCCTATTCA CCCCCC--- -TCTAGGCGA CTATCAATTG GTATCAGAGC
*****
λwx 5513 CCGGTGCTTC ATTAGAGCCT AACCGCTCGA AGTGATGTCT GGAGATCCGA ATTCGTGAC
PREM2 1327 CCGGTGCTTC ATTAGAGCCT AACCGCTCGA AGTGATGTCT GGAGATCACC CCAAGAAGGA
*****
λwx 5574 GTCGACCGCC GCAACTGTGT ACGGCGGCTC TTCCTGACTT ATGGTCCAAA ATAAACATGT
5635 GGTCCTTGTA CTCTAGCTTA AAAAGGCTAA GATGATGATT TCTTTGAAGA AAGGTGCGCG
5696 CAATGCAGCA CTTCGGATTA GATGTTGCTG CTGTGTGTGG GCACTTGCTT GCTGCAGCCC
5757 TAGCTACCAA TAATATGGTG ACCAACAATA ATTACAATC TTAATATCTA CTCCTTCATC
5818 TTGACATTAT TACTTAGAAT CAGGAACAGA TCTAAAATGT TATCGTGCCC TACTGGATTT
5879 ACTTCTTTTG TCTTTCATCT TAATTATTAT TTTAGACCGG ATCAAATCAG TGGCAGATAC
5940 ATGCTTCTAG TCTGTGGCCC AGGACATGAT CTATATATCT CTACTTATAT TTGTTGTTTT
6001 TTTGATCAAA ATATATTGAA CCAAACCACA GAGAGAATAG TCTACTGGCT CGTAGTTAAC
6062 ATGTCTCGAG AGTAGGAAAT AATATATATC CAGCAGTGTA CCTAGCACCT TAGATTCGAA
6123 AGCGAGCAGC GGGCGACCCA TGGATCGTTT CCTGTGCTG TTCCCCTACC AAAAGTGACG
6184 AGGAATTATT ATATATATAT ATATGTTGCA AATTAACCTG ACCCATCCAT CTCACGTGAA
6245 AAACGAACGT ACTTGTCGTT GCATTATTGC TGTGGCGGA ACCAAAAGAG CGAGTGCATG
6306 CTAGCTACCG ACGGTGGTTA AGTTCACCGG CACCGATGGA GGTGTGTTCT TGACGACACT
6367 CTGGCCTGCC ACCGGCCAGA GTATAGCCTA ATGATTATTG GTGACATAGG CCGGACGACG

```

6428 ATTTGCTTGC TTGCTTCTTC GTCCATTTTT CTCCTGCTAG CTAGCCGCAG CAGCAGCCAG
6489 CCAAGGACAC TGAAAATGCA TGTAAACAA GCACCACCAC CTCTGATGAC AGCGTAAGCA
6550 CAAAGAGAGA AGAAACAAA CGACATTATT GATATCTAGT GCATCAGCTA AGTGCTCCAC
6611 TTTGCACACC AAATTTCTCT CTTTGTGCAC ATGGTATGGT ACGTAGCTTC AGCCCAAAC
6672 ACCAATTTAA ACCCGAATTA GACCACATGC AACATGCCCT AGAGAGGATA TAGTTCGGTT
6733 CCAACGCTCA ACTACACTAT TCTATTGAGG CGTATAAGTG CCTAACACG ACTTGAGACT
6794 TGAAATATGC TTTAAGCTCA TTAGAAAATA APTTCATCCC ATTAATATATC AATATGAAGC
6855 TTTTTACCCT TCTTTTTAGT TTTGGTTTTT AATCATAACC TTCCACTACC TTACAAGAAT
6916 AATCATTAAAT GATTGTCAAC ATATAACAAG AACAAACCAA TAGAAGGCTT GCGAGATGGT
6977 GCATATAAAT TAGAATGAAT ATAATCAAGA ATACCATTAC TTTTATGATT ATAGGTATTA
7038 AATGACGCC TCTTGTGTTT TCCAAACATA CAATGCTCAC AGAACTGTAG TTTTACTAAC
7099 GATATGTTCA TAAAGACCTC TTTTGCATAA TTCATGTAAT GTTTGCTCAC TCATATGTCC
7160 AAGATGCATA TGACAAAGAT TAGTAGCATC AAAATTAGAT AATGAAAAAA AAATATAGTA
7221 GCATCACTCG TACCACAAAG ACGGTGCAAA TTTTGAGATT TTAATTCACC TTTCAAACA
7282 ATAAGAGAAC CTCTTAGCAT CTTTAAACT CCATCCTCAC TAAAGAACCCT CTTTGTGCTT
7343 ACGCTGTCAT CAGTCGAGGT TATGGTAATG CCATCACACA TCTTAATTTG AATGATTTG
7404 GTCCCAACAA TATCATGTGG ACTATCAATA ATGCATATAT GAAATGAAGC AGTGAATCA
7465 AGAATTCATT CATCACTACT ATTTGCACAT CTAGCAAAG CAACAAGTAT CTCACCATTT
7526 AAATTAATCTA CCTTAGAAAG CAACAACATA TGCTTTACCT TCATTATTAG ATTTACCTTT
7587 CTTTCTATAT GACTAGTTC TCTTTGTTCT TTAATTTATA ACAGTCGGTC ATAAAATAAT
7648 TGTCTTCTT GCAATACTTG TAGAATTTAT CTCTCTTCCT TTGATATTTT GAATGGACTT
7709 TATAACCATT ACAATTCTAC CTATATTTCC ATTGATTGAT TTATTTTCTG TCCTCCCACG
7770 AACAGATACA CTTCTCCATT GGAAACAGAA CCTTCATAAG ATACCATATG TTTTCATATTT
7831 TTCTTGGCGT GCAAAACCTC ACAAACCTCA TCCATTATTA GAGTATCATG ACTATATAGT
7892 AATGTACCTC TGAAGTTTGC AAAAAAAAAA CTAGGCAAAA AGAACAAAAG AATAAGACTC
7953 ANATCTCCTT GAAGACCGAA AGATGGTTAA GCATAGAACC ACTCTCTTGT AACTTGTGTG
8014 TGTATAACTT TACATTCATA TGCACCTTTC TCTCFAATC CTTAGACATG TAAATTGGCT
8075 CTAGATTGAG CCATGAAGCA TCTGTAGTTT TCTCTTCTAA ACAATCTTGC AAAATATTAT
8136 TTGAAAGATG GAGTTGAATT TGATTCAAGG TCTTATGATC TTTTCTCTTC TTCTCATCAA
8197 CCCAAGATTT TGAATCTTTT TTATCAAGAG CATCATCGAC TTCAGTTTGT GTAAGAATAG
8258 CTCTCATCTT CACTTGCCAA AGAGCCGATC TTGTGTCACG AATCACGATC CAGAGGTGAC
8319 ATATCATGCT TCATCGATAT GGCAAAGAAA TAAGATCAAT AACGAGAAGA AAAACATAAT
8380 CTACAGGTGT AATCCTAGCA GAAACATGTA GTCTAGTACA CAACCTATAT ATGATCAGCA
8441 ATAAACTTGG ACCTTCTAAT AATCTACTTG GATGCATGTA GCAAACGTGT TGAAATCTAA
8502 TTTTCTCCAC TATGATCAA CAACGACAAG GCAAGAGAAA TTTGATTGCT TCTTCTATTC
8563 ATATGTACTT GATGGTTGTT AGAGAAGGCA CATTATGAGC CTCACGTCTT CTATGGACAC
8624 GGACGACACC TTTTCTCCTC CTTTGTAGT TGGATCAGAC ACCACCGAT AGAATCCTGC
8685 AACCAAAATC AACTCTGCCT CTCGGCACAA GCTTTTGCAA ATAATTTGGC AACACTAATC
8746 AATGACCGCA CAAAAATTAA CACTCTGACT CAAAGACACC GAACAGTAGA CCCAATGCG
8807 CGTAACGACA CTACAACTA ATTACTAGAT TTTTGTCAA TCCCGTATCT AGCTCTATGG
8868 CACTTGTAT CAAATAATAC AAATATGGAT CACGCACGAG ACACGAAAAT TTATGTGGAC
8929 CAAAAAAAT CTTTAGAAAA GAAACAACGT GCGCTAACCA AAATCTTTTA GTATATATAA
8990 GAAGGGTTTA TATAGAAATG AAGAATACAA TTAGGCCTAG TTTAAGTAGC TTCGTGTCTA
9051 CCTCAATCCA CATATGTATT GAGAAAGATT ACGGTGTAAT TTGTTTAAAG TTTCACCTTA
9112 ATACACCTTA ATATTTGTCT ATTTAGATGA ATACGAGAGT ATCTAAATAA GGCCTAAGTC
9173 ATCTCTTTTC ATGTGACTTA GTGTGTGTGT CTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT
9234 ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT AATGCAGACT
9295 AAAATCCAAA TAATAAAGG ATATCCGCTA ATGACGTGAA TCGAAACAGG ATCCTCCAGT
9356 GTCCCCACAA TCACGTTAGA ATTTGGCATGC GCGAAAGGCG GGATGAGAGA ACCCCGACC
9417 GTCGTCGAC

A sequência completa do clone *λwx-Ast222* está representada na forma de esquema na Figura 20. As sequências do clone que não apresentaram identidade significativa para nucleotídeos e para aminoácidos estão representadas pelas linhas pontilhadas. A região do clone *λwx-Ast222* com identidade ao gene *waxy* corresponde à região promotora contendo o TATA boxe e a região contendo os Exons 1-6 (E1-E6). A sequência que apresentou identidade a nível de nucleotídeos com o *PREM2* corresponde à região da LTR5', PBS e início da região *gag*. Adjacente à esta sequência existe uma região do clone que apresentou similaridade em nível de aminoácidos com as poliproteínas dos retrotransposons *Ta1* (Voytas & Ausubel, 1988) e *Tnt1* (Grandbastien *et al.*, 1989).

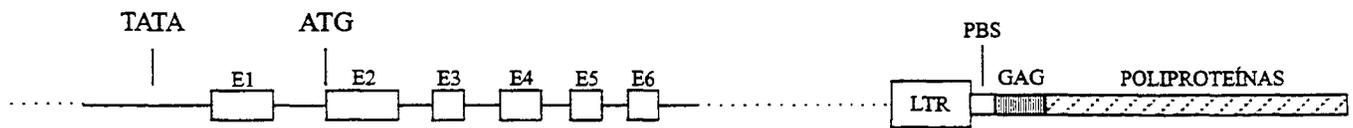


Figura 20- Esquema representando a sequência do clone $\lambda wx-Ast222$. As linhas pontilhadas simbolizam sequências de DNA que não apresentaram similaridade significativa com sequências do GENBANK. A sequência do gene *waxy* está representada pelo TATA, exons (E1-E6) e introns (linhas entre os exons). As regiões denominadas de LTR (terminação longa e repetida), PBS (sítio de ligação do primer) e início da região GAG correspondem à sequência do clone $\lambda wx-Ast222$, que possui alta similaridade de nucleotídeos com estas regiões do retrotransposon *PREM2* (Turcich *et al.*, 1996). A representação das poliproteínas foi dada pela similaridade dos aminoácidos com esta região dos retrotransposon *Tal* e *Tnt1*.

Experimentos de PCR foram realizados com o objetivo de confirmar a existência no genoma Ast222wx da sequência de 1.9kb sem identidade do clone $\lambda wx-Ast222$. Além disso, foi verificado se a mesma estaria também presente no genótipo Ast222N. Nas reações de PCR, foi utilizado primer 2160 da sequência waxy combinado com o primer 2395 da sequência 1.9kb (Tabela 1). Como pode ser observado na Figura 21, um fragmento de aproximadamente 200pb foi amplificado em reação de PCR a partir de amostras de DNA genômico de várias sublinhagens Ast222wx (Figura 21a, colunas 1-4), da progênie F₁(Ast222-P147 x L222) (Figura 21b, colunas 3, 5-7) e do clone $\lambda wx-Ast222$ (Figura 21a, coluna 9). O sequenciamento deste fragmento amplificado a partir da sublinhagem Ast222-P147, a mesma utilizada na construção do banco genômico, apresentou 100% identidade com o clone $\lambda wx-Ast222$ (Figura 22). Portanto, foi confirmado que esta sequência de 1.9kb, posicionada na região flanqueadora 3' da sequência waxy do clone $\lambda wx-Ast222$ (nt 2277-4184, Figura 19) está presente na sublinhagem Ast222wx-P147. Além disso, foi demonstrado que esta sequência está presente nos outras sublinhagens Ast222wx e ausente nos genótipos Ast222 normal, L222, Ast-o2 e W64 (Figura 21a, colunas 5, 6, 7 e 8, respectivamente).

A obtenção de produtos amplificados por PCR nos genótipos mutantes somente foi possível após a digestão do DNA com as endonucleases *XbaI* e *PstI* ou *HindIII* e *PstI*. O tratamento com endonucleases foi testado com o objetivo de minimizar o problema causado pela formação de estruturas secundárias em regiões ricas em GC, que haviam apresentado problemas no sequenciamento do clone $\lambda wx-Ast222$. Esta estratégia foi apropriada para confirmar que a sequência desconhecida de 1.9kb está presente no genótipo utilizado na construção do banco genômico e demonstrar que esta sequência está presente também nas outras progênes mutantes waxy da linhagem Ast222.

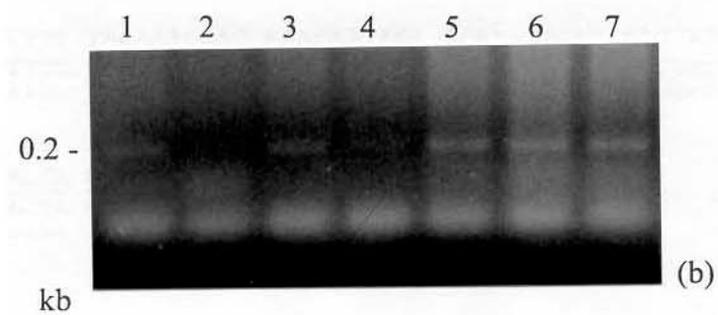
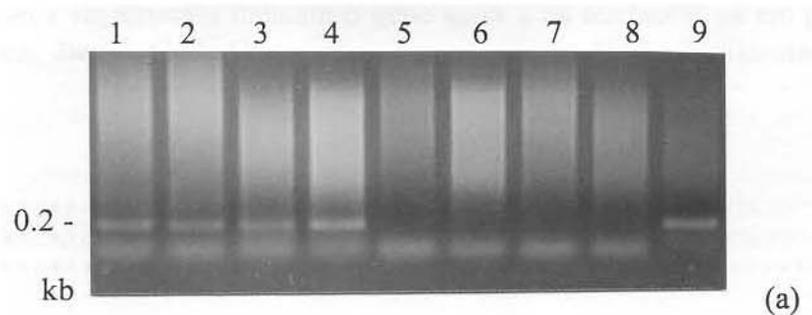


Figura 21- Fotografia de gel de agarose contendo fragmentos de DNA genômico de milho resultantes da amplificação por PCR, utilizando-se os primers 2160 e 2395 (Tabela 1). (a) Coluna 1 e 2 = Ast222wx-P147; 3 e 4 = Ast222wx; 5 = Ast222 normal; 6 = L222; 7 = Ast-o2; 8 = W64; 9 = clone $\lambda wx-Ast222$. (b) Coluna 1 = Ast222wx-P147; 2-7 = $F_1(Ast222wx-P147 \times L222)$.

Figura 22- Alinhamento da sequência de nucleotídeos (nt) do clone *λwx-Ast222* (*λwx*) com a sequência do fragmento amplificado por PCR a partir do DNA genômico *Ast222wx-P147*. Os nucleotídeos sublinhados representam os oligonucleotídeos utilizados como primers na reação de PCR. Os nucleotídeos em amarelo indicam o gene *waxy* e os nucleotídeos em preto representam o restante do clone *λwx-Ast222*. Observar a ocorrência de 100% similaridade entre as duas sequências.

<i>λwx</i>	2161	<u>TCAACAACAA</u>	<u>CCCCTACTTC</u>	<u>TCCGGACCAT</u>	<u>ACGGTAAGAG</u>	<u>TTGCAGTCTT</u>	<u>CGTATAATTC</u>
<i>Ast222</i>	1	<u>TCAACAACAA</u>	<u>CCCCTACTTC</u>	<u>TCCGGACCAT</u>	<u>ACGGTAAGAG</u>	<u>TTGCAGTCTT</u>	<u>CGTATAATTC</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
<i>λwx</i>	2221	<u>TGTTGAGCTC</u>	<u>GACAATCTTC</u>	<u>ACAGGAAACG</u>	<u>GCCCATCAGA</u>	<u>CGGACTGTTCAT</u>	<u>TTTACACAA</u>
<i>Ast222</i>	61	<u>TGTTGAGCTC</u>	<u>GACAATCTTC</u>	<u>ACAGGAAACG</u>	<u>GCCCATCAGA</u>	<u>CGGACTGTTCAT</u>	<u>TTTACACAA</u>
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
<i>λwx</i>	2281	TCTTCACAGG	ATACCATACA	ATTGAAAGGA	TGTAGATGGC	TAGCGGGGATA	AATACCCTA
<i>Ast222</i>	121	TCTTCACAGG	ATACCATACA	ATTGAAAGGA	TGTAGATGGC	TAGCGGGGATA	AATACCCTA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
<i>λwx</i>	2341	TAATTTTTTT	TACAAACCAC	AAACAATAGA	GCAAATTGAT	TAGTATGTATP	GAAACCCCA
<i>Ast222</i>	181	TAATTTTTTT	TACAAACCAC	AAACAATAGA	GCAAATTGAT	TAGTATGTATP	GAAACCCCA
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
<i>λwx</i>	2401	<u>AGAACTACTA</u>	<u>CTTTCTCTA</u>				
<i>Ast222</i>	241	<u>AGAACTACTA</u>	<u>CTTTCTCTA</u>				
		*****	*****				

De acordo com a sequência de nucleotídeos com alta identidade ao gene *waxy* foi proposto um esquema representando a estrutura e o mapa de restrição da sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ (Figura 23). Neste esquema observam-se dois sítios de reconhecimento para a endonuclease *PvuII* na região promotora do gene. Estes dois sítios de reconhecimento da *PvuII* também podem ser observados na região promotora do gene *waxy* da linhagem W22 (Figura 23b). Entre os dois mapas existe uma diferença de 2 nt no primeiro sítio (Pv80 e Pv82) e de 17 nt no segundo (Pv312 e Pv329). O terceiro sítio de reconhecimento da endonuclease *PvuII* na sequência *waxy* do clone localiza-se no nucleotídeo 2022 (Figura 23a). Na sequência *waxy* da linhagem W22 este sítio está na posição 2120 (Figura 23b). No exon 1 da sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ existem dois sítios *Sall*, um na posição 971 e o outro na 978 (Figura 23a). Acrescentando-se os 35 nucleotídeos que foram perdidos na sub-clonagem, a posição 978 do sítio *Sall* mudará para 1013. Desta forma, a distância entre os sítios *Sall* na sequência *waxy* do clone seria de 42 nucleotídeos. A distância que separa os dois sítios *Sall* do gene *waxy* descrito na literatura é de 41 nucleotídeos (Figura 23b, posições 1028 e 1069). Estes dois sítios *Sall* da Ast222wx e da W22 localizam-se no exon 1. O único sítio de reconhecimento da endonuclease *PstI* na sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ localiza-se na posição 2126 (Figura 23a). Este mesmo sítio está na posição 2224 na sequência *waxy* descrita na literatura (Figura 23b). A comparação do mapa de restrição das duas sequências *waxy* demonstra que os sítios de reconhecimento das endonucleases da região promotora até o intron 6 na sequência da linhagem W22 são as mesmas existentes na sequência *waxy* da linhagem Ast222wx. Apenas existem polimorfismos para as posições dos sítios das enzimas *PvuII*, *Sall* e *PstI*. Estes resultados estão de acordo com os resultados de sequenciamento, que demonstram o alto grau de identidade da região promotora até o intron 6 do gene *waxy* entre a linhagem W22 e o genótipo Ast222wx.

O mapa de restrição da sequência *waxy* (Figura 23a) obtido a partir do clone $\lambda wx-Ast222$ confirmou resultados obtidos em Southern blots. Foi constatada a inexistência de sítios *HindIII*, *EcoRV*, *XhoI* e *EcoRI* (Figuras 6-9) e a existência de sítios *SalI* e *PvuII* (Figura 12 e 13) dentro da sequência codificadora *waxy* do genótipo Ast222wx.

A identificação de sítios de reconhecimento das endonucleases *SalI* e *PvuII* na região codificadora do alelo *wx* da Ast222 permite algumas comparações entre os resultados de polimorfismo de restrição, subclonagem e mapa de restrição do clone genômico. A digestão do DNA genômico do genótipo Ast222wx com as endonucleases *HindIII* e *SalI* resultou em fragmentos de 3 e 1.5kb homólogos à sonda *waxy* (Figura 12 e 13; Coluna 3). O fragmento de 3kb somente foi visualizado na hibridização com a sonda da região promotora do gene *waxy* (Sonda 1). Por outro lado, o fragmento de 1.5kb foi visualizado na hibridização com a sonda da região codificadora (Sonda 2). O fragmento de 3kb observado no Southern de DNA genômico (Figura 13) pode ser o mesmo do clone Sal2. A sequência de Sal2 demonstrou que este clone contém a região promotora até o exon 1 do gene *waxy*, corroborando a observação do fragmento de 3kb em hibridização apenas com a sonda da região promotora e não com a Sonda 2. Observando-se o mapa de restrição do clone $\lambda wx-Ast222$, pode-se sugerir que o clone Sal2 foi gerado pela restrição da endonuclease *SalI* nas posições 1 e 3023 (Figura 24). E o fragmento de aproximadamente 3kb visualizado no Southern blot pode ter sido gerado pelas restrições de *HindIII* na posição 89 e *SalI* na posição 3023 (Figura 24). O fragmento de 1.5kb visualizado no Southern blot (Figura 12, coluna 3) pode estar no clone Sal3. Esta correspondência é sugerida porque este fragmento somente foi visualizado em hibridização com a Sonda 2, contendo a região 2100 a 4519 da sequência *waxy*. Além disso, o sequenciamento demonstrou que o clone Sal3 contém apenas a região compreendida entre os nucleotídeos 1068 e 2376 da sequência *waxy*. Este fragmento de 1.5kb

pode ter sido gerado pelas restrições com a endonuclease *SalI* na posição 3030 e pela *HindIII* na posição 4622, de acordo com o mapa do clone $\lambda wx-Ast222$ (Figura 24). O clone Sal3 (~4.5kb) foi provavelmente gerado pela restrição da endonuclease *SalI* nas posições 3030 e 7580 (Figura 24).

Comparando-se o mapa de restrição do clone $\lambda wx-Ast222$ (Figura 24) com o Southern blot das Figuras 12 e 13 (coluna 8) pode-se confirmar a existência de um sítio *PvuII* dentro da região codificadora do gene *waxy*. O fragmento de 2.4kb resultante da digestão dupla *PvuII-EcoRI* (Figura 12, coluna 8), homólogo à região nt 2100 a nt 4519 do gene *waxy* (Sonda 2) foi, provavelmente, gerado pela restrição do sítio *PvuII* na posição 4074 do clone $\lambda wx-Ast222$ e do sítio *EcoRI* na posição 6337.

A comparação dos resultados de Southern blot com o mapa de restrição e a sequência de nucleotídeos do clone $\lambda wx-Ast222$ permite concluir que a disposição dos sub- clones neste clone genômico é Sal2, Sal3 e Sal4, respectivamente.

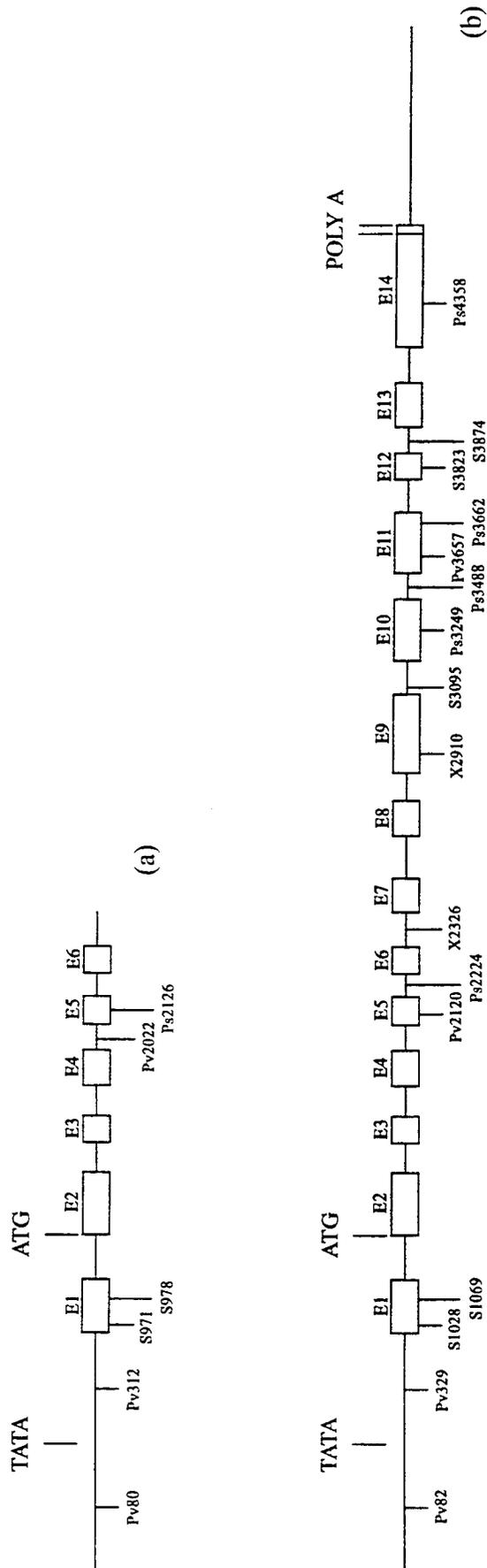


Figura 23- Esquema representando a estrutura e o mapa de restrição das seqüências de DNA do gene *waxy*. (a) Esquema da seqüência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$, de acordo com a Figura 19. (b) Esquema da seqüência *waxy* da linhagem americana W22 (Klõesen *et al.*, 1986). Os retângulos simbolizam os exons (E1-E14) e os introns estão representados pelas linhas entre os exons. As endonucleases de restrição estão simbolizadas por: Pv = *PvuII*; Ps = *PstI*; X = *XhoI*.

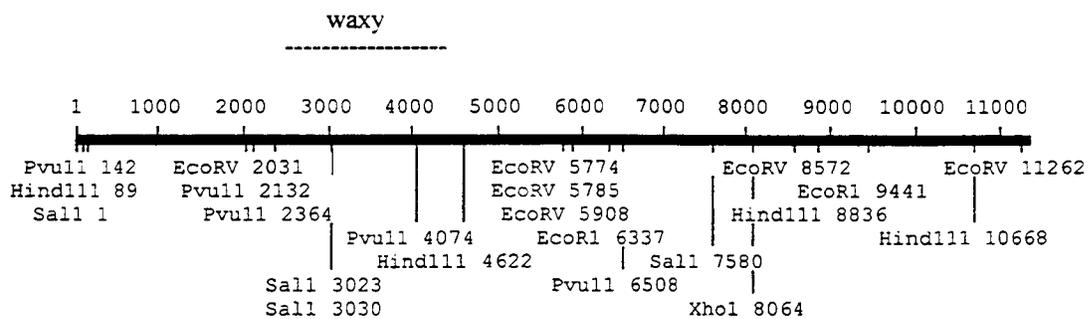


Figura 24 - Mapa de restrição do clone $\lambda wx-Ast222$ baseado na sequência de nucleotídeos. Neste clone, a sequência waxy inicia-se no nucleotídeo 2052 e termina no nucleotídeo 4328.

Análises do genoma de diversos genótipos de milho foram realizadas através de Southern blot, com o objetivo de avaliar a representatividade da sequência sem identidade de 1.9kb que interrompe a região codificadora do gene *waxy* da linhagem Ast222. As amostras de DNA genômico dos genótipos Ast222wx, L222 e F₁(Ast222wx x L222) foram tratadas com a endonuclease *EcoRI*. A hibridização foi realizada com uma sonda de 2.3kb correspondente à sequência desconhecida mais uma parte com identidade ao **PREM2**, localizada aproximadamente entre os nt 2301-4569 (Figura 19). Foram observados três fragmentos de 3.1, 4.2 e 7.5 kb e também um intenso 'background' homólogos à Sonda 2.3 em todos os genótipos avaliados (Figura 25). A hibridização desta mesma região com as linhagens Ast222 normal, W23 e Ast-o2 resultaram também nestes mesmos três fragmentos com homologia à Sonda 2.3 (dados não apresentados).

Com o objetivo de caracterizar a representatividade da LTR5' do **PREM2** nos genomas estudados foi realizado um experimento de Southern blot. Amostras de DNA dos genótipos F₁(Ast222wx x L222), Ast222wx e L222 foram tratadas com a endonuclease *EcoRI* e hibridizadas com a Sonda 600. Esta sonda corresponde à região com identidade ao início da região *gag* e parte da LTR5' do **PREM2** (nt 4974-5560). Nesses três genótipos foram observados fragmentos de aproximadamente 3.1 e 7.5kb e um intenso 'background' com homologia à Sonda 600. Os fragmentos visualizados neste experimento provavelmente correspondem aos mesmos fragmentos observados na hibridização com a Sonda 2.3, pois esta sonda também possui sequência com identidade ao **PREM2**.

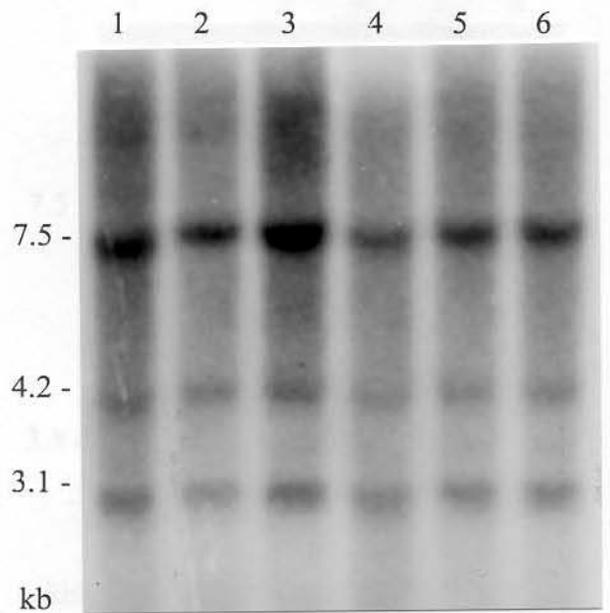


Figura 25 - Autorradiograma de amostras de DNA genômico digeridas com *EcoRI* e hibridizadas com a Sonda 2.3. A Sonda 2.3 corresponde à região sem similaridades do clone $\lambda wx-Ast222$ mais uma sequência semelhante ao retroelemento *PREM2* e está localizada entre os nucleotídeos 2301-4569 (Figura 19). Colunas 1, 4-6 = $F_1(Ast222wx \times L222)$; 2 = *Ast222wx*; 3 = *L222*.

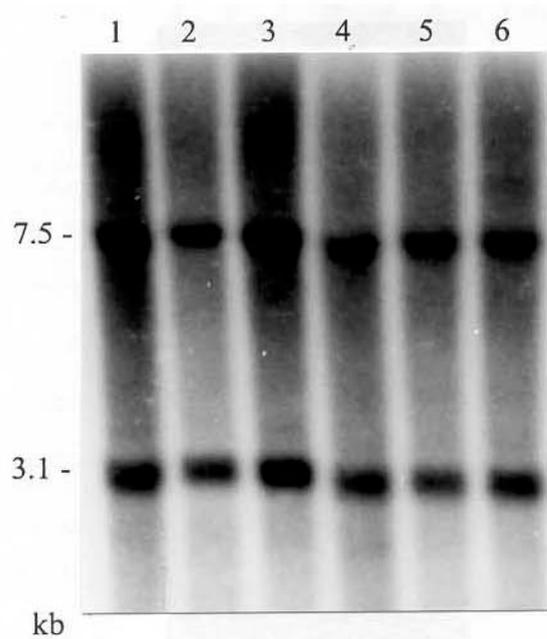


Figura 26 - Autorradiograma de amostras de DNA genômico digeridos com *EcoRI* e hibridizados com a Sonda 600. A Sonda 600 corresponde à sequência de DNA com similaridade ao início da região *gag* e da LTR5' do retrotransposon ***PREM2*** (nt 4974-5560, Figura 19). Colunas 1, 4-6 = F₁(Ast222wx x L222); 2 = Ast222wx; 3 = L222.

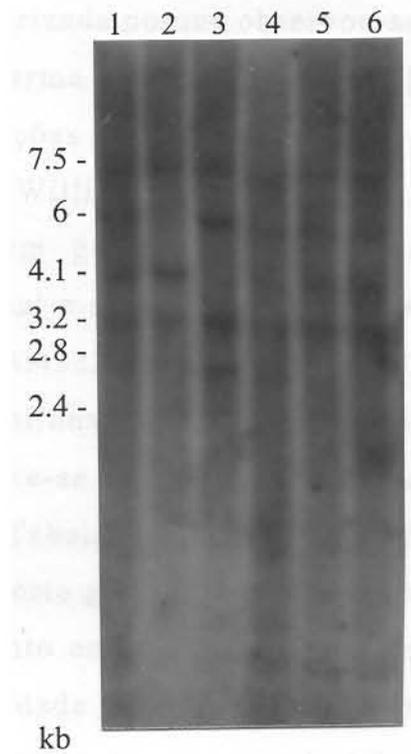


Figura 27- Autorradiograma da hibridização de amostras de DNA genômico de milho, digeridas com a endonuclease *EcoRI* e hibridizadas com a sonda S4. Esta sonda é a região do clone λ wx-*Ast222* que possui similaridade de aminoácidos com as poliproteínas de retrotransposons (nt 5574-9425, Figura 19). Coluna 1, 4-6= F_1 (*Ast222wx-P147* x L222); 2=*Ast222wx-P147*; 3=L222.

5- Discussão

O sistema gerador de instabilidade existente na linhagem Ast222 continua a produzir altas frequências de mutação no loco *waxy*. Esta linhagem foi caracterizada porque observou-se o aparecimento de mutações em genes de endosperma no retrocruzamento [Ast-o2/RC1(Ast-o2 x L222)] e também nas gerações de autofecundação para derivação da linhagem Ast222 (Prof. Dr. William José da Silva, comunicação pessoal). Este mecanismo atuou em gerações avançadas de autofecundação, gerando instabilidade germinal e somática nos locos *waxy* (*wx*) e *amylose-extender* (*ae*) na linhagem Ast222 (Branquinho, 1993). Surpreendentemente, em cruzamentos da sublinhagem Ast222wx-P147, na geração S11, com a linhagem L222 obteve-se alta frequência de sementes normais com setores *wx* (Figuras 3 e 4; Tabela 3). Portanto, o mecanismo indutor de mutação continuou atuando neste germoplasma. As mutações ocorrem em genótipos *Wxwx* e *Aeae*, portanto em progênies que segregam os fenótipos normal e mutante. A instabilidade somática dos alelos *Wx* e *Ae* geram clones de células mutantes em endosperma normal. A instabilidade somática foi mais comumente observada nas gerações de autofecundação da linhagem Ast222 com o genótipo *wxwxAeae*. Estas progênies segregaram para os fenótipos *waxy*, *amylose-extender* e enrugado. O fenótipo enrugado é decorrente da mutação dupla nos locos *waxy* e *amylose-extender* (Branquinho, 1993). Assim, a instabilidade do alelo *Ae* gerou sementes *waxy* com setores enrugados (Figura 5). Os genes *wx* e *ae* estão envolvidos na via biossintética do amido do endosperma e, de modo interessante, as mutações na linhagem Ast222 parecem ser restritas a esses dois locos.

Nas gerações de autofecundações da linhagem Ast222 observou-se, em geral, um ou dois setores com instabilidade em apenas uma ou duas sementes por espiga. Embora a existência de instabilidade tenha sido clara, a sua frequência foi considerada baixa. Por outro lado, ocorreu um

aumento significativo de mutações somáticas no loco *waxy* em cruzamentos com a linhagem L222. A atividade do sistema indutor de mutações foi observada como tendo a característica de baixas frequências nas gerações avançadas de autofecundação da linhagem Ast222 e também nos cruzamentos com duas outras linhagens de milho não aparentadas a este germoplasma e também com o parental Ast-o2. Por outro lado, foi observado que as mutações somáticas *waxy* neste germoplasma podem saltar para altas frequências em cruzamentos com a linhagem L222.

Nos cruzamentos Ast222wx-P147 x L222, o genótipo mutante foi utilizado como fêmea, portanto o endosperma F_1 possuía um alelo *Wx* (L222) e dois *wx* (Ast222). Assim, o aparecimento de setores mutantes é resultante da instabilidade do alelo *Wx* da L222. Como a linhagem L222 é estável, a instabilidade do loco *Wx* deve estar associada ao genótipo Ast222wx. A mutação no loco *waxy* do germoplasma estudado surgiu na linhagem Ast222 e nas gerações S7-S10 continuamente se observou instabilidade neste gene. Portanto, as evidências indicam que a instabilidade do alelo *Wx* destas progênies F_1 e F_2 está associada com o mesmo mecanismo que tem gerado as mutações nos locos *wx* e *ae* da linhagem Ast222. O tamanho dos setores mutantes nas sementes normais das progênies F_2 (Ast222wx-P147 x L222) variou, indo de pequenos pontos a grandes manchas (Figuras 3 e 4). Este fato demonstra que a instabilidade do gene *waxy* pode ocorrer ao longo do desenvolvimento do endosperma. Em todas as gerações da linhagem Ast222 observou-se que a mutação ocorre sempre no sentido do alelo *Wx* para o *wx*. Este resultado demonstra que o alelo *wx* é estável, pois ele não reverte para o fenótipo normal. Este fato foi comprovado com a avaliação de sublinhagens *wxwxAeae* e *wxwxAeAe*. Aproximadamente 1.000 plantas destes genótipos foram autofecundadas e os descendentes avaliados para as mutações de endosperma. Em nenhuma progênie foi observada a reversão da mutação *waxy* para o normal, demonstrando assim a estabilidade do alelo *wx*. Em

todas as gerações da linhagem Ast222 nunca foi observada variação nos fenótipos das sementes que indicasse uma expressão intermediária do gene *waxy*, considerando-se o grau de resolução proporcionado pelo teste de iodo e pelas observações fenotípicas.

Quando o presente trabalho foi iniciado, o gene *waxy* já havia sido clonado (Shure et al., 1983) e totalmente sequenciado (Klõesgen et al., 1986). Assim, o loco *waxy* foi escolhido para continuidade dos estudos da instabilidade genética da linhagem Ast222, focalizando-se principalmente em análises moleculares. Várias progênies de autofecundação previamente derivadas foram avaliadas nos experimentos iniciais. Todas estas progênies de autofecundação apresentavam baixas frequências de instabilidade somática, consistindo de 0-2 sementes por espiga. Esta baixa frequência de instabilidade não permitia estabelecer uma correspondência entre um parental com endosperma instável e a indução de instabilidade na sua progênie. Considerou-se que esta característica de atividade de indução de mutações era importante para a escolha da sublinhagem adequada para a continuidade dos estudos moleculares desta instabilidade. Assim, paralelamente aos estudos de polimorfismo de restrição, foram realizadas análises genéticas que levaram à seleção da sublinhagem P-147 da linhagem Ast222wx, diretamente associada à instabilidade. Em cruzamentos, esta sublinhagem é capaz de gerar altos níveis de indução de mutação no loco *Wx* da linhagem L222, capacidade esta herdável nos descendentes F2. A possibilidade de estudar a linhagem endogâmica Ast222 e progênies de um cruzamento com o parental L222, ambos associados com a instabilidade do loco *Wx*, estimulou a continuidade da avaliação molecular deste germoplasma.

Nas análises genéticas previamente realizadas, não havia sido possível determinar se a mutação *waxy* seria a mesma em todas as progênies (Branquinho, 1993). Por isso, nas análises iniciais de polimorfismo de restrição do mutante *waxy* da linhagem Ast222 foram

avaliadas várias sublinhagens mutantes. Nestes experimentos iniciais, utilizando-se Southern blots e sonda cDNA *Wx-P*³², foi demonstrado polimorfismo de restrição entre o alelo normal e mutante, para várias endonucleases. Por outro lado, não foi observado polimorfismo de restrição dentro das sublinhagens Ast222 normais ou dentro de sublinhagens mutantes autofecundadas. A sequência codificadora do alelo *Wx* da Ast222 possui sítios de restrição para as endonucleases *HindIII*, *EcoRV* e *XhoI*, os quais estão ausentes no alelo *wx* (Figuras 6 e 7, coluna 6; Figura 8, coluna 5).

As análises por Southern blot das progênes F_1 (Ast222wx-P147 x L222) utilizando sondas do gene *waxy* demonstraram que algumas destas progênes apresentavam fragmentos *waxy* adicionais aos alelos *Wx* e *wx* herdados dos parentais. Estes fragmentos provavelmente foram gerados por alterações no sítio de reconhecimento das endonucleases *EcoRI* (Figura 9, coluna 10), *XhoI* (Figura 10, coluna 8), *HindIII* (Figura 11, coluna 1), *HindIII* e/ou *Sall* (Figura 12, coluna 6). Como estas progênes F_1 apresentaram alta frequência de instabilidade somática no gene *waxy* pode-se suspeitar da ação do mecanismo indutor de mutações com as alterações nos sítios destas endonucleases. As alterações podem ser decorrentes da geração de novos alelos *waxy*, ou ainda por mudanças dos sítios em regiões flangeadoras do gene, devido à ação do sistema indutor de mutações existente na linhagem Ast222. Provavelmente alguns destes novos alelos são mutantes, por permitirem a observação de clones de células mutantes *waxy* em endosperma normal. Para se observar o fenótipo mutante *waxy* nas progênes F_1 era necessário ocorrer mutação apenas em um alelo *Wx*, portanto um único evento de mutação neste alelo seria suficiente para produzir células com fenótipo mutante. A fraca intensidade dos fragmentos *waxy* extras aos alelos *Wx* (L222) e *wx* (Ast222) observada nas progênes F_1 provavelmente se deve a uma menor frequência de células com as novas sequências comparada com o maior número de células contendo os alelos

herdados dos pais. Este fato está fenotipicamente bem caracterizado pelas sementes apresentadas na Figura 4. Nestas sementes pode-se observar a relação muito maior de células com fenótipo normal do que mutante. Na Figura 4a a semente possui quase a metade de células com fenótipo mutante, portanto a instabilidade do gene *waxy* ocorreu no início do desenvolvimento do endosperma. Este evento possibilitou a geração de um grande número de células mutantes. A análise por Southern blot de uma progênie com esta característica pode gerar fragmentos *waxy* com novos alelos com intensidades maiores. Isto talvez tenha ocorrido com as progênies que possuem os fragmentos de 8kb e 1kb na coluna 1 da Figura 11 e na coluna 6 da Figura 12, respectivamente. Por outro lado, eventos de instabilidade do alelo *Wx* em fases mais tardias do desenvolvimento do endosperma, como nas Figuras 4d e 4f, geram menor quantidade de células mutantes. O pouco número de células mutantes com novas sequências *wx* podem ser comparados com a fraca intensidade dos fragmentos *waxy* extras de ~10kb (Figura 9, coluna 10) e o de ~8.7kb (Figura 10, coluna 8).

Os resultados indicaram que existe um padrão de restrição único entre as várias sublinhagens mutantes *waxy* nas gerações de autofecundação (Figuras 6-8). Portanto, as várias sublinhagens Ast222wx parecem apresentaram a mesma alteração na sequência *waxy*, detectável com as endonucleases utilizadas. Polimorfismos de restrição foram observados entre as linhagens L222, Ast-o2 e Ast222, dentro e fora da sequência codificadora *waxy*. Polimorfismo de restrição fora de sequências codificadoras parece ser bem mais comum, enquanto que espera-se que seja mais raro dentro da região codificadora de uma mesma linhagem. O fato de que mudanças nos sítios de restrição fora da sequência codificadora são mais comuns, deve-se provavelmente à uma menor força de seleção para as mudanças ocorridas em regiões não codificadoras, comparando-se com as regiões codificadoras (Kimura, 1977). Desta forma, não seria esperado que alterações tão dramáticas na posição dos sítios de restrição,

como aquelas encontradas entre os alelos *Wx* e *wx* da Ast222, fossem provocadas por mutações de ponto. Alterações simultâneas acontecendo para vários sítios de restrição dentro de um mesmo gene não devem ser atribuídas a mutações de ponto, pois para isto seria necessário que a taxa de mutação nos organismos, e em particular nesse gene, fosse muito alta. É muito mais provável que a alteração em vários sítios de restrição seja causada por deleção ou inserção de sequências de DNA. Sendo assim, ficou evidente que os polimorfismos dos sítios de restrição na sequência codificadora *waxy* entre os alelos normal e mutante da linhagem Ast222 ocorrem provavelmente devido a uma deleção de sequência de DNA no alelo mutante. Para ter ocorrido inserção de DNA, o alelo *wx* deveria ter a soma dos fragmentos de restrição maiores que o alelo *Wx*. Estes resultados não foram observados nos estudos da linhagem Ast222. Outro resultado que indica a deleção no alelo *wx* é a inexistência de vários sítios de restrição quando comparada com o alelo *Wx*. A fraca intensidade em que são observados os fragmentos contendo o alelo *wx* nas análises por Southern blot também é um forte indício de deleção deste alelo.

O clone $\lambda wx-Ast222$ obtido a partir do DNA genômico da linhagem Ast222 possui a região promotora e parte da sequência codificadora *waxy* (exons 1-6). A sequência codificadora restante, de ~2kb (exons 7-14), do gene *waxy* está ausente no clone $\lambda wx-Ast222$. Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar a inexistência desta significativa porção da sequência *waxy* neste clone. Este fato ocorreu porque a endonuclease *MboI*, utilizada na construção do banco genômico, cortou o gene *waxy*? Ou simplesmente o alelo *wx* da linhagem Ast222 não possui realmente toda a sequência codificadora do gene *waxy*? Ou seja, a deleção parcial do gene *waxy* no clone $\lambda wx-Ast222$ é real no DNA genômico Ast222wx ou seria um artefato de técnica? A sequência de nucleotídeos que substituiu a região codificadora do gene *waxy* seria resultante de uma recombinação de dois fragmentos independentes durante o processo de clonagem? As hipóteses

sobre estes possíveis problemas técnicos na construção do banco genômico são descartadas com base nos resultados de polimorfismo de restrição e de amplificação via PCR da região de junção do intron 6 com a sequência flanqueadora 3'. O sequenciamento desse fragmento de PCR demonstrou que parte da região codificadora do gene *waxy* foi substituída por uma mesma sequência de DNA em todas as sublinhagens Ast222wx avaliadas. Os resultados obtidos com os experimentos de Southern blot (Figura 12 e 13) também permitem a confirmação da não ocorrência de problema técnico na construção do banco genômico do genótipo Ast222wx-P147.

Os experimentos de Southern blot com amostras de DNA da sublinhagem Ast222wx-P147, tratadas com as endonucleases *HindIII/SalI* e *EcoRI/PvuII* e hibridizadas com duas sondas distintas do gene *waxy*, permitiram comparações do padrão de restrição deste genótipo com o mapa de restrição do clone $\lambda wx-Ast222$. O alelo *wx* da linhagem Ast222 não possui sítio de reconhecimento para as endonucleases *HindIII* e *EcoRI* (Figura 6 e 9, coluna 3). Com isto, os resultados das digestões duplas indicam que se ocorreu restrição dentro da sequência codificadora, elas devem ser das endonucleases *SalI* e *PvuII*. Analisando o padrão de restrição da sublinhagem Ast222wx-P147 tratado com a endonuclease *SalI* verificamos apenas dois fragmentos, um de ~1.5kb e outro com ~3kb, com homologia às sondas 1 e 2 do gene *waxy* (Figura 12 e 13, coluna 3). O fragmento de ~3kb somente foi visualizado na hibridização com a sonda da região promotora (Sonda 1). Portanto, este fragmento deve conter uma região flanqueadora 5' do gene *waxy*, mais uma porção do próprio gene (Figura 13, coluna 3). Este fragmento de ~3kb observado no autorradiograma pode ser o mesmo do sub-clone Sal2, proveniente do clone $\lambda wx-Ast222$, uma vez que o clone Sal2 possui toda a região promotora e parte do exon 1. O segundo fragmento observado na digestão de DNA do genótipo Ast222wx com a endonuclease *SalI* com homologia à sonda *waxy* é de ~1.5kb (Figura 12, coluna 3). Este fragmento somente foi

visualizado na hibridização com a sonda da região codificadora do nucleotídeo 2100 a 4519 (Sonda 2). Portanto, espera-se que este fragmento possua ao menos parte da sequência codificadora situada à 3' do nucleotídeo 2100. O fragmento de ~1.5kb observado no Southern blot pode ser parte do sub-clone Sal3, uma vez que este sub-clone possui apenas a região do exon 1 ao intron 6 do gene *waxy* (nt 1549 até 2376). Comparando-se estes resultados, se na linhagem Ast222wx os exons 7-14 estivessem presentes o esperado seria que os Southern blots revelassem fragmentos *waxy* adicionais àqueles clonados. Isto não ocorre, pois os fragmentos clonados são dois e no Southern blot também apenas dois fragmentos de tamanhos correspondentes são observados. Estes resultados também podem ser comparados com os da linhagem L222, que expressa normalmente a enzima produzida pelo gene *waxy*, onde a digestão com *Sall* gerou 7 fragmentos com homologia às sondas 1 e 2 do gene *waxy* (Figura 12 e 13, coluna 4). O resultado obtido com o tratamento de amostras de DNA da linhagem L222 com a endonuclease *Sall* é aparentemente mais compatível com o número de sítios *Sall* existentes no gene *waxy* da linhagem W22 (Klõesgen *et al.*, 1986). Nesta sequência observaram-se 5 sítios *Sall* nas posições 1028, 1069, 3095, 3823 e 3874 (Figura 23b). Somente a ocorrência de um número elevado de sítios como este poderia gerar tantos fragmentos homólogos às duas sondas *waxy* como o observado na linhagem L222. Por outro lado, a ausência de vários desses sítios poderia ocasionar a redução do número de fragmentos *Sall* no mutante Ast222wx, como observado nas Figuras 12 e 13. No mapa de restrição da sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ existem sítios *Sall* nas posições 971 e 978 (Figura 23a). Estes dois sítios podem ser equivalentes aos sítios das posições 1028 e 1069 da sequência *waxy* da linhagem W22. Se forem acrescentados 55 nucleotídeos que estão ausentes ao longo da sequência do clone, a posição 971 passaria para 1026. Se à posição 978 acrescentarmos estes mesmos 55 nucleotídeos, mais os 35 que suspeita-se terem sido

perdidos na sub-clonagem, teremos então a posição 1068. A distância entre os dois sítios *Sall* no mapa de restrição da sequência waxy do clone $\lambda wx-Ast222$ é de 7 nucleotídeos, mas se considermos os 35 perdidos na sub-clonagem, a distância passa a ser de 42 nucleotídeos. Esta distância entre os sítios *Sall* da sequência waxy do clone é diferente em apenas um nucleotídeo do número de bases que separa estes dois sítios na sequência waxy da linhagem W22. Assim, os dois sítios *Sall* da sequência do clone $\lambda wx-Ast222$ estão em posições muito semelhantes ao alelo *Wx* da W22. Portanto, com esta semelhança na posição de dois sítios *Sall* entre a sequência waxy do clone da linhagem Ast222 com a sequência da linhagem W22, questiona-se o fato de não se observar os fragmentos gerados pela restrição em posições semelhantes a 3095, 3823 e 3874, como existe na sequência da W22. Seria esperado que estes sítios também estivessem mais ou menos conservados no gene. Assim, um número maior de fragmentos waxy seria produzido com o tratamento com a *Sall*, se estes três sítios de restrição existissem no genótipo Ast222wx. É importante ressaltar que estes três sítios *Sall*, não detectados no DNA genômico Ast222wx, estão posicionados exatamente na região waxy que está ausente no clone $\lambda wx-Ast222$.

Analisando o mapa de restrição da sequência waxy do clone $\lambda wx-Ast222$, observamos que os sítios da endonuclease *PvuII* estão nas posições 80, 312 e 2022 (Figura 23a). Assim, o tratamento com a endonuclease *PvuII* geraria fragmentos de 232 nt (das posições 80 e 312) e 1744 nt (das posições 312 e 2022). Os fragmentos do genótipo Ast222wx-P147, gerados pela restrição dupla com *EcoRI* e *PvuII*, são de ~2.4 e ~1.8kb (Figura 12 e 13, coluna 8). Estes fragmentos provavelmente foram gerados pela restrição da *PvuII*, já que não existe sítio de reconhecimento para a endonuclease *EcoRI* dentro da sequência codificadora waxy do genótipo Ast222wx-P147 (Figura 9, coluna 3). O fragmento de ~1.8kb foi

visualizado apenas na hibridização com a Sonda 1, contendo a região promotora (Figura 13, coluna 8). Este resultado indica que o fragmento de ~1.8kb deve conter a região promotora do gene *waxy*, portanto, ele pode ter sido gerado pelos cortes nas posições 312 e 2022. O fragmento de 232 nucleotídeos provavelmente foi perdido na migração do DNA. O fragmento de ~2.4kb pode ter sido gerado pela restrição nas posições 4074 dentro da região codificadora e na posição 6508 do clone *waxy* (Figura 24), já que este fragmento somente foi observado com a Sonda 2, correspondente à região 2100 a 4519 do gene *waxy* (Figura 12, coluna 8). Aparentemente, o número de fragmentos obtidos com a digestão da sublinhagem Ast222wx-P147 com *PvuII* e hibridizados com as sondas 1 e 2 do gene *waxy* está coerente com o mapa de restrição do clone $\lambda wx-Ast222$.

Os sítios *PvuII* na sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ estão nas posições 80, 312 e 2022. Se acrescentarmos os 15 nucleotídeos que estão ausentes na sequência *waxy* do clone da linhagem Ast222 antes da posição 312, teríamos então o sítio *PvuII* na posição 327. Continuando os acréscimos de nucleotídeos, a posição 2022 passaria então para 2120. Os acréscimos seriam de 63 nucleotídeos de deleções ao longo da sequência *waxy* no clone e 35 nucleotídeos, que provavelmente foram perdidos na sub-clonagem. A sequência *waxy* da linhagem W22 possui 4 sítios *PvuII* nas posições 82, 329, 2120 e 3657. Com as correções sugeridas, a sequência *waxy* do clone $\lambda wx-Ast222$ teria os sítios *PvuII* nas seguintes posições 80, 327 e 2120. Portanto, a posição dos 3 primeiros sítios *PvuII* está muito semelhante entre as duas sequências *waxy*. Novamente observa-se a inexistência de um sítio de restrição na sequência *waxy* do clone, justamente na região sugerida como sendo deletada na sublinhagem Ast222wx. Assim, como na linhagem W22, a L222 aparenta ter vários sítios *PvuII* na sequência codificadora do gene *waxy*. Pois nesta linhagem foram observados 5 fragmentos com homologia às sonda *waxy* 1 e 2 (Figura 12 e 13, coluna 9). A observação de apenas dois fragmentos com

homologia às duas sondas waxy no genótipo Ast222wx-P147, de tamanho menor que os da L222, novamente indicam a deleção no alelo mutante da Ast222.

Comparando-se a posição do sítio de restrição da endonuclease *PstI* no clone $\lambda wx-Ast222$ com a sequência waxy da linhagem W22 pode-se observar uma grande alteração. O clone $\lambda wx-Ast222$ possui apenas um sítio *PstI* e a sequência waxy da linhagem W22 possui 5 sítios (Figura 23). O único sítio *PstI* do clone $\lambda wx-Ast222$ está em uma posição semelhante a da sequência waxy da linhagem W22. Realizando as devidas correções, o sítio *PstI* estaria na posição 2221 da sequência waxy do clone e na sequência da W22 ele está na posição 2224. Porém, os outros sítios *PstI* presentes na W22 não existem na Ast222wx. A posição destes sítios encontra-se justamente na região suspeita de deleção no genótipo Ast222. Estes resultados novamente indicam a existência de uma região do gene waxy relativamente conservada entre as linhagens Ast222wx e W22.

Reunindo as informações das posições dos sítios de restrição para as endonucleases *Sall*, *PvuII* e *PstI* verificou-se que a sequência waxy do clone $\lambda wx-Ast222$ possui 6 sítios de restrição correspondentes à sequência waxy da linhagem W22. Portanto as principais diferenças entre as duas sequências se limitam à região situada após a posição 2326, aparentemente devido à ausência desta região na sequência waxy presente no clone $\lambda wx-Ast222$. Os resultados de polimorfismo de restrição do alelo wx dentro da sequência codificadora deste gene corroboram o mapa de restrição do clone $\lambda wx-Ast222$. A comparação dos resultados de polimorfismo de restrição e dos mapas de restrição do clone $\lambda wx-Ast222$ e os dados de literatura permitem sugerir que ocorreu deleção da sequência codificadora correspondente aos exons 7-14 no alelo wx da linhagem Ast222wx.

Os resultados obtidos por PCR também corroboram a sugestão de deleção na sequência codificadora do gene waxy na sublinhagem

Ast222wx. Nestes experimentos, não foi possível amplificar sequências waxy das diferentes sublinhagens mutantes da linhagem Ast222. Porém, nas várias sublinhagens Ast222 normal e linhagens controle obteve-se sequências waxy amplificadas por PCR. Estas sequências amplificadas eram do tamanho esperado para a região do exon 8 ao 14 do gene waxy. Portanto, aparentemente o alelo normal da Ast222 nesta região deve ser semelhante ao alelo *Wx* descrito na literatura. Por outro lado, o alelo *wx* era diferente, pois não foi observada amplificação de qualquer sequência utilizando-se os mesmos primers nas reações de PCR. Este resultado indicou que a origem do fenótipo mutante waxy deveria ser consequência de alterações na sequência codificadora, envolvendo a sequência a partir do nucleotídeo 2688. Foram realizadas tentativas de amplificação por PCR da região promotora até o exon 14 do gene *waxy* da linhagem Ast222. No entanto, os únicos resultados positivos de amplificação restringiram-se aos primers da região do exon 8 ao 14 nos genótipos Ast222 normal. O fato de não se ter conseguido amplificar as regiões 5' do gene *waxy* pode ser devido ao alto teor de guanina e citosina característico da região do exon 1 ao 4 deste gene que dificulta a reação de amplificação (Varagona *et al.*, 1992). Na tentativa de desestabilizar estas estruturas foi utilizado o análogo de base 7-deazaguanina na mistura de reação de PCR (McConlogue *et al.*, 1988). Entretanto, mesmo utilizando-se este recurso técnico não foi possível amplificar sequências 5' dos alelos normal e mutante da Ast222 (dados não apresentados).

Os experimentos de northern blot demonstraram que os alelos mutantes de várias sublinhagens waxy não contêm mRNA waxy. Ausência de transcritos pode ser uma consequência de alterações na região promotora ou codificadora do gene. As alterações podem ser deleção ou inserção de sequência de DNA, ou ainda pode ser que a metilação do gene impeça a transcrição. A ausência de transcritos também pode ser decorrente de transcritos com baixa estabilidade, portanto facilmente

degradados. A inserção de DNA no gene também pode levar à produção de transcritos alterados, como observado no loco *waxy* de milho por Varagona *et al.*, (1992). Neste estudo, foram caracterizados três alelos *wx* estáveis, resultantes da inserção dos retrotransposons *Stonor*, *B5* e *G* em introns. A caracterização destes alelos foi de particular interesse porque, apesar da inserção de grandes fragmentos de DNA no loco, ainda ocorre a produção de transcritos *Wx*. Os três alelos *wx* produzem mRNA *Wx*, além de transcritos alternativos. Estes transcritos alternativos apresentam diferenças no ‘splicing’ em exons próximos aos sítios de inserção dos retrotransposons. Assim, o ‘splicing’ alternativo possibilita a produção de moléculas de mRNA de mesmo tamanho do normal, além da produção de outras moléculas de mRNAs de tamanhos maiores (Varagona *et al.*, 1992). Em levedura e em *Caenorhabditis elegans*, foi observado que a presença de códon de terminação prematuro na primeira metade 5’ de transcritos, leva à degradação dos mesmos (Pulak & Anderson, 1993; Belgrader & Maquat, 1994; Jacobson, 1996). A presença de insertos de DNA dentro de genes pode levar à produção de códons de terminação prematuros, que por sua vez podem levar à rápida degradação do mRNA. Códons prematuros na metade 3’ do gene parecem ter um menor efeito de desestabilização do mRNA (Marillonnet & Wessler, 1997).

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que a ausência de mRNA *waxy* do alelo mutante da Ast222 pode estar ocorrendo devido à deleção da sequência codificadora a partir do intron 6. Pois o gene *waxy* possui exons de 1-14 e introns de 1-13 (Klösgen *et al.*, 1986). Neste caso, estariam faltando oito exons para o alelo *wx* da Ast222 estar completo. A substituição desta região codificadora *waxy* por uma sequência de nucleotídeos desconhecida (Figura 19), poderia levar à criação de sinais de terminação da transcrição, com conseqüente produção de transcritos instáveis.

O que poderia então ter gerado esta deleção da sequência codificadora do gene *waxy*? Vários mecanismos genéticos poderiam induzir a deleção na sequência codificadora do gene *waxy* na linhagem Ast222. Obviamente, a presença de sequências similares à retrotransposons na região flanqueadora 3' do alelo *wx* sugere que estas sequências possam ter um função ativa na indução de mutações neste germoplasma. Por outro lado, alguns outros mecanismos genéticos têm sido descritos como capazes de ocasionar deleção de sequências codificadoras de genes e também produzir instabilidade somática. Um exemplo em milho foi descrito para o gene que codifica as zeínas de 27kDa em milho. O alelo *S* deste gene é constituído de dois segmentos de DNA, o gene *A* e o *B*. Cada um destes segmentos possui uma cópia funcional do gene. Na linhagem A188, o alelo *S* possui a capacidade de se rearranjar ativamente para originar o alelo *Ra*, que possui apenas o segmento *A* (Das *et al.*, 1990). Este rearranjo ocorre devido a um 'crossing-over' homólogo na extremidade 3' dos genes *A* e *B*. Este rearranjo ocasiona a deleção de um segmento gênico. O rearranjo do alelo *S* para o *Ra* é detectado em experimentos de Southern blot com amostras de DNA genômico tratado com várias endonucleases e hibridizados com sondas do gene *A* ou *B*. A atividade de rearranjo em plantas homozigotas (*S/S*) é relativamente raro, pois observou-se dois rearranjos completos de *S* para *Ra* em 300 sementes imaturas de 25 espigas. Em progênies F_1 (*S/Ra*) a atividade foi menor ainda, pois não foi observado rearranjo em aproximadamente 100 embriões e endosperma destas progênies. Na população F_2 observou-se em aumento considerável de rearranjos, pois ocorreu desvio de segregação da proporção de plantas *S/S*: *Ra/S*: *Ra/Ra* (1:2:1). As proporções alélicas aberrantes provavelmente refletem o aparecimento também de tecidos quiméricos, que contêm células derivadas das células progenitoras contendo ou não os rearranjos. De forma semelhante ao aumento na frequência de rearranjo do alelo *S* do estoque A188 em progênies F_2 , observa-se que a instabilidade do loco

waxy da linhagem Ast222 também foi maior nas gerações F_1 e F_2 (Ast222wx x L222). Neste loco, observou-se que a instabilidade somática do gene ocorre frequentemente em genótipos $Wxwx$, porém em genótipos $wxwx$ e $WxWx$ não foi observada a ocorrência de instabilidade. Extensivos estudos genéticos com o milho demonstraram que as duplicações em genes são estáveis. Por isto, a instabilidade do alelo *S* é incomum e provavelmente específica para o estoque genético estudado, pois outras linhagens e outras culturas do estoque A188 são estáveis para o alelo *S* (Das *et al.*, 1990). Talvez um mecanismo incomum de recombinação entre os alelos *wx* e *Wx* esteja ocorrendo neste loco da linhagem Ast222, como ocorre no alelo *S* da cultura da linhagem A188. Neste caso, a instabilidade somática do loco *waxy* da linhagem Ast222 poderia ocorrer por recombinação entre as cromátides irmãs, já que não foi detectada duplicação no gene *waxy*. A recombinação poderia ocorrer durante as divisões celulares para formação do endosperma. Nesta fase do desenvolvimento, as células estão em processo constante de divisão mitótica. Uma possível ocorrência de recombinação mitótica entre as partes homólogas dos alelos *Wx* e *wx* pode ocorrer normalmente. Porém, se esta troca de segmentos de DNA envolver a região deletada do alelo *wx* pode ter início um evento de recombinação não-homóloga. Este tipo de recombinação ilegítima é não-conservativa, pois ocorre perda ou ganho de um número pequeno de nucleotídeos no sítio de recombinação de DNA (Osman & Subramani, 1998). No caso da recombinação entre os alelos *Wx* e *wx*, a ocorrência de recombinação ilegítima pode ocasionar deleção no alelo *Wx*. Estes eventos dariam origem aos setores *waxy* no endosperma normal, e portanto aos novos alelos do gene *waxy* nas progênies F_1 (Ast22wx-P147 x L222). Em 1995, foi descrito que o rearranjo gênico do alelo *S* da linhagem A188 está associado à presença de um retrotransposon, o *Zeon-1*. Neste trabalho foi sugerido por Hu *et al.* que a retrotransposição do *Zeon-1* pode estar associada ao rearranjo gênico somático que ocorre no gene da zeína de 27kDa. No alelo

wx da linhagem Ast222 existem sequências de DNA com identidade a retrotransposons. Portanto, poderíamos também suspeitar do envolvimento deste tipo de elemento de transposição na instabilidade do loco *waxy* deste germoplasma.

Um outro exemplo de recombinação gênica capaz de induzir mutações ocorre com o gene *P* de milho. Este gene é responsável pela pigmentação vermelha do pericarpo da semente, da espiga e de outros tecidos florais da planta. O gene *P* é flanqueado por dois segmentos de DNA, que são repetições diretas. Foi observado a ocorrência de inserção de elementos *Ac* neste gene que originaram novos alelos. O alelo *P-ww* deste gene foi gerado por uma deleção de 17kb do alelo *P-ovov*, a sequência deletada constituía-se de 4.5kb do elemento *Ac* e 12.5kb do loco *P*. Foi sugerido que o mecanismo envolvido na geração do mutante *P-ww* está associado com a quebra da dupla fita do DNA seguida de recombinação entre as sequências diretamente repetidas que flanqueiam o gene *P*. O mecanismo para geração dos mutantes *P-ww* pode ser devido a trocas desiguais entre as repetições diretas de cromátides irmãs. Caso o 'crossing-over' desigual ocorra entre cromátides irmãs, uma célula filha deverá possuir uma fita com a deleção, provavelmente correspondendo as células do setor mutado. A outra célula filha deverá ter a fita recíproca com a duplicação, portanto o tecido normal. A DSB pode ter sido feita pela transposase do elemento *Ac* que está neste loco. Não se sabe ao certo se o mecanismo de recombinação é dependente da atividade do elemento *Ac*. Ou se o simples aumento na distância, causada pela inserção do elemento entre as repetições é suficiente para a ocorrência do mecanismo de deleção. Portanto, neste trabalho foi sugerido que o elemento *Ac* induz a recombinação homóloga no loco *P*, devido à desestabilização das sequências diretamente repetidas que estão flanqueando o gene (Athma & Peterson, 1991). Para a ocorrência de deleção e o aparecimento do fenótipo variegado alguns requisitos foram necessários, como a existência de

duplicação de sequência em região flanqueadora do gene e a presença de um transposon. No caso do loco *waxy* da linhagem Ast222 não se sabe da existência de sequências duplicadas em regiões flanqueadoras do gene, e nem foi observada a existência de um transposon, mas sim de sequências similares a retrotransposons. Por isto, parece pouco provável que um mecanismo de recombinação como ocorreu com o alelo *P-ovov* estaria acontecendo no alelo *Wx* deste germoplasma. Ou ainda, esta poderia ser a primeira descrição do envolvimento de retrotransposon com mecanismos de recombinação no gene *waxy*.

Outro transposon que também está envolvido com rearranjos gênicos é o *Mu* de milho. A presença deste elemento no gene *Kn1-O* pode ocasionar vários tipos de rearranjos cromossômicos associados com uma duplicação em tandem de 17kb deste gene (Mathern & Hake, 1997). A duplicação de 17kb é composta de toda a região codificadora, mais 400pb de sequência flanqueadora 5' e 10kb da sequência flanqueadora 3'. Em alguns casos, a inserção do *Mu* aumenta a frequência de recombinação no alelo *Kn1-O* criando alelos derivados, nos quais o elemento e uma cópia da repetição foram perdidas. Estes alelos derivados apresentaram o fenótipo normal. Em dois outros alelos derivados, não ocorreu a perda da duplicação, mas apenas do *Mu*, e em substituição ao elemento foi inserido um fragmento de 1.7kb e outro de 3kb. Estas inserções são de sequências que normalmente encontradas em região flanqueadora de uma das unidades de repetição. Assim, os alelos derivados ficaram com a duplicação em tandem separadas por inserções de sequências flanqueadoras. O alelo que possui a inserção de 1.7kb minimiza a expressão do fenótipo 'knotted', enquanto que a inserção do fragmento de 3kb suprime completamente o fenótipo 'knotted'. A produção destes alelos derivados foi explicada como sendo resultante da conversão gênica, que por sua vez foi estimulada pela DSB gerada pela excisão do *Mu* (Mathern & Hake, 1997). A inserção do elemento *Mu* aumenta a instabilidade da duplicação em tandem do loco

Kn1-O em 100-2000 vezes (Lowe *et al.*, 1992). Não se tem evidências de excisão de elementos de transposição no loco *waxy* da linhagem Ast222, mas sim de possível inserção. Além disso, não foi encontrada qualquer evidência molecular ou genética de que o gene *waxy* poderia estar duplicado neste genótipo. Portanto, a ocorrência de um mecanismo genético semelhante ao gene *Kn1-O* no loco *waxy* do germoplasma Ast222 seria pouco provável.

Como pode ser verificado, os exemplos de ocorrência de recombinação homóloga e de conversão gênica acontecem em genes que possuem duplicação, seja duplicação deles mesmos ou de sequências flanqueadoras. Como o gene *waxy* não está duplicado, a ocorrência de recombinação e de conversão gênica dentro do gene dificilmente pode estar ocorrendo na linhagem Ast222. Outro fato que também distingue o mecanismo de instabilidade do loco *waxy* da linhagem Ast222 destas ocorrências de rearranjos cromossômicos é a alta frequência de instabilidade somática observada em progênies F_2 (Ast222wx x L222). A literatura descreve que os rearranjos gênicos somáticos desvinculados de ação de transposons são raros e frequentemente estão associados com eventos significantes do desenvolvimento. Exemplos destes eventos são: variação antigênica em *Borrelia*, recombinações ilegítimas para criar diversidade no sistema imune de mamíferos, cultura de tecidos de plantas, e outros. Nenhum exemplo de alta frequência de rearranjo gênico somático tem sido descrito, exceto quando os transposons estão presentes no loco (Das *et al.*, 1990).

Tem sido descrito que pode ocorrer um aumento na recombinação homóloga intracromossômica em células somáticas de *Arabidopsis* devido à expressão da endonuclease HO. Recombinação entre duas repetições invertidas do gene GUS defeutivo foi induzida pela endonuclease HO (Chiurazzi *et al.*, 1996). Os germoplasmas Ast222 ou L222 poderiam ter uma atividade da endonuclease HO que estimularia os eventos de

recombinação entre os alelos *Wx* e *wx*? Neste caso, as altas frequências de instabilidade deste loco deveria ocorrer em outros cruzamento da sublinhagem Ast222 com a L222. Caso a endonuclease HO estivesse ativa na linhagem Ast222, eventos de instabilidade deveriam ocorrer com maior frequência nas progênies autofecundadas. Portanto, parece pouco provável que a ação desta enzima esteja envolvida no mecanismo de instabilidade genética do loco *waxy* da linhagem Ast222.

Um outro mecanismo natural que frequentemente está associado com a deleção de sequência de DNA e com instabilidade somática é a atividade de transposons. O gene *waxy* é constantemente visitado por elementos de transposição, tanto assim que foi observado que metade dos mutantes *waxy* resultam da inserção de DNA no gene (Wessler & Varagona, 1985). Portanto, a instabilidade do loco *waxy* na linhagem Ast222 poderia realmente estar relacionada com a presença de um elemento móvel do genoma. Até 1992, todas as mutações decorrentes de inserções de DNA no gene *waxy* eram causadas por transposons. Nesta data, foi descrita pela primeira vez a inserção de retrotransposons neste loco. A inserção dos retroelementos *Stonor*, *B5* e *G* geraram três novos alelos do gene *waxy* condicionando fenótipos intermediários estáveis (Varagona *et al.*, 1992).

As evidências experimentais permitem sugerir que a instabilidade do loco *waxy* da linhagem Ast222 está associada com a presença de um elemento móvel do genoma. As principais evidências que suportam esta sugestão são: a ocorrência de mutações nos locos *waxy* e *amylose-extender* durante 12 gerações de autofecundação da linhagem Ast222, a alta frequência de instabilidade somática do loco *waxy* nas sementes F₁ e F₂ (Ast222wx-P147 x L222), a existência de sequências de nucleotídeos flanqueando o alelo *wx* na extremidade 3' com identidade de nucleotídeos com os retrotransposons *PREM-2* e *Ji3* e de aminoácidos com os retrotransposons *Tal* de *Arabidopsis* e *Tnt1* de tabaco.

As características da instabilidade dos locos *waxy* e *amylose-extender* da linhagem Ast222 indicavam que o mais provável mecanismo responsável pela instabilidade no loco *waxy* seria de um transposon, por que estes elementos geram alta frequência de instabilidade e são ativados independentemente da condição ambiental. A possibilidade de ocorrência de um retrotransposon associado ao loco foi inicialmente considerada pouco provável, pois os retrotransposons descritos até o momento são inativos sob condições ambientais normais (Wessler, 1996). No entanto, a constatação da não reversão da mutação *waxy* nesse germoplasma e as análises da sequência do clone $\lambda wx-Ast222$ indicam que o responsável mais provável pela instabilidade seja um retrotransposon, pois sequência com identidade à retrotransposons foram encontradas no clone $\lambda wx-Ast222$. De acordo com estes resultados, algumas considerações sobre um putativo retrotransposon do loco *waxy* da linhagem Ast222 serão realizadas, admitindo-se que a sequência que está inserida no intron 6 do gene *waxy* representa o início de um retrotransposon ainda não descrito na literatura. Este retrotransposon seria então, constituído de uma LTR 5' de 1.8kb e as terminações desta região podem ser compostas pelos nt canônicos 5'TG..CA 3' (nt 2302 e 4057, Figura 19). Assim, a sequência com alta identidade ao *PREM2* (nt 4186-5561) pode constituir parte desta LTR. Ou ainda, esta sequência semelhante ao *PREM2* pode representar a inserção de um elemento dentro de outro, já que a ocorrência destes eventos são comuns em milho. O próprio *PREM2* foi caracterizado porque estava inserido dentro de um outro elemento, o *PREM1* (Turcich *et al.*, 1996).

As LTRs dos retroelementos são divididas em três regiões funcionais - U3, R e U5. A região U3 contém o promotor para a RNA polimerase II, com sequências regulatórias do tipo TATA e CCAAT boxes. A região R é definida pela presença de um sítio de poliadenilação e a U5 é a região abaixo deste sítio (Birnstiel *et al.*, 1985). Observando-se o alinhamento da sequência de nucleotídeos do clone $\lambda wx-Ast222$ com o

retroelemento **PREM2** (Figura 19) nota-se que a grande maioria das diferenças entre as duas sequências se restringem aos nucleotídeos 1900 até 2603. Nesta sequência encontra-se a região U3 da LTR 5' do retrotransposon **PREM2**. Portanto, pode-se sugerir que existem diferenças entre a região U3 da LTR 5' do **PREM2** com a sequência do clone λwx -*Ast222*. O tamanho da região U3 em retrovírus é a parte mais variável entre as LTRs das diferentes espécies de vírus (Temin, 1981). A alta semelhança entre a sequência do clone λwx -*Ast222* com as regiões R e U5 do **PREM2** e do *Ji3* (nt 2604-3252) demonstra existir neste clone uma sequência altamente conservada entre dois diferentes retrotransposons. O experimento de hibridização de DNA genômico com a putativa LTR do retroelemento (Sonda 2.3) do alelo *wx* da linhagem *Ast222* demonstrou que o elemento presente neste loco é predominante no genoma das linhagens *Ast222wx* e *L222* (Figura 23, colunas 2 e 3). Este resultado foi sugerido porque foi observado um intenso 'background' de hibridização com a sonda da putativa LTR. Este 'background' é resultante da visualização de vários fragmentos de tamanhos graduais com homologia à Sonda 2.3. Este resultado da hibridização de sequências com identidade ao **PREM2**, sugerindo uma predominância deste retroelemento no genoma de milho, está de acordo com o observado por Turcich *et al.* (1996). Neste trabalho, o **PREM2** foi descrito como um retrotransposon predominante e muito frequente em diversas linhagens de milho, como mostrado na Figura 26. Resultado semelhante foi obtido na hibridização das linhagens *L222* e *Ast222wx* com a sequência de DNA que possuiu alta identidade com a LTR 5', PBS e início da região *gag* do **PREM2** (Sonda 600).

Na maioria dos retrotransposons de plantas o sítio de ligação do primer para o início da transcrição reversa da primeira fita de DNA, é complementar à extremidade 3' do iniciador do tRNA de metionina. Na sequência de nucleotídeos do putativo retrotransposon do loco *waxy* da linhagem *Ast222* existe uma região complementar à extremidade 3' do

iniciador de tRNA de metionina (nt 5500-5512, Figura 19). Este local poderia ser o PBS do putativo retroelemento. Na região interna das LTRs dos retrotransposons, logo após o PBS, existem ORFs semelhantes aos genes *gag* e *pol* dos retrovírus (Grandbastien, 1992). Entre os retrotransposons descritos na literatura existe uma grande divergência das sequências de nucleotídeos desta região. Porém, a comparação de aminoácidos permite verificar a existência de alguns domínios conservados entre retroelementos de diferentes espécies. A sequência de nucleotídeos que se encontra abaixo do PBS do putativo retrotransposon não possui identidade em nível de nucleotídeos com nenhuma sequência descrita no GenBank. Porém, em nível de aminoácidos esta sequência possui similaridade com a região das poliproteínas de retrotransposons de várias espécies, como o *Tal* de *Arabidopsis*, *Tnt1* de tabaco e *copia* de *Drosophila*. Este resultado está de acordo com a literatura que descreve a divergência de sequências de nucleotídeos e a conservação de alguns aminoácidos das regiões codificadoras dos genes envolvidos na retrotransposição. Experimentos de hibridização com a Sonda S4 com DNA genômico das linhagens Ast222wx e L222 permitiram verificar que a sequência de nucleotídeos do clone $\lambda wx-Ast222$ com similaridade a poliproteínas é bastante frequente nestes genótipos. Os resultados estão apresentados na Figura 27 onde podem ser observados quatro fragmentos individuais e um intenso 'background' com homologia à região de poliproteínas nos genótipos Ast222wx e L222 (Figura 27, colunas 2 e 3). Nos genótipos $F_1(Ast222wx \times L222)$ com alta instabilidade foram observados cinco fragmentos com homologia à região de poliproteínas.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a possível existência de uma LTR 5', do PBS e de uma região parcial de poliproteínas de um putativo retrotransposon. Portanto, para a descrição de um retroelemento completo está faltando a LTR 3'. Suspeita-se que esta parte do elemento exista na sublinhagem Ast222wx, embora esteja ausente no

clone $\lambda wx-Ast222$. Fato semelhante ocorreu na descrição do retrotransposon *Ji3*, pois este elemento foi descrito apenas pela existência de uma LTR 5' e do PBS (SanMiguel *et al.*, 1996). Os resultados sugerem que o putativo retrotransposon do loco *waxy* da linhagem Ast222 possui aproximadamente 7.4kb. As LTRs deste elemento podem conter ao redor de 1.8kb e as regiões das ORFs possuírem aproximadamente 3.8kb. O tamanho deste putativo retrotransposon, bem como da sua LTR, está de acordo com os tamanhos dos retroelementos de plantas. No entanto, em todos os retrotransposons de plantas descritos até o momento existe uma duplicação de 5-8 pb da sequência hospedeira flanqueando o elemento. No caso da sublinhagem Ast222wx, não se sabe quais são os nucleotídeos duplicados porque não se obteve a LTR 3'. Estas bases duplicadas, em geral, estão localizadas entre o elemento e a sequência hospedeira. Portanto, se consideramos o início da LTR 5' deste putativo retrotransposon como sendo a sequência TGAAA (nt 2302, Figura 19), a separação do elemento para o gene *waxy* seria de 24 nt. Este número de nucleotídeos não é o normalmente encontrado na separação do DNA hospedeiro para o elemento. Entretanto, este putativo retrotransposon da linhagem Ast222 pode não iniciar e terminar com os nucleotídeos canônicos TG..CA, como ocorre com *Tos17*, que se inicia com TG e termina com GA (Hirochika *et al.*, 1996). Além disso, as LTRs podem não ser flanqueadas por pequenas extremidades invertidas e repetidas e sim por repetições diretas, como ocorre com o *BAGY1* (Panstruga *et al.*, 1998). Portanto, para uma melhor caracterização das LTRs deste putativo retrotransposon é necessário estudar a LTR3'. Estas análises moleculares, bem como o comportamento de alta atividade mutagênica permitem sugerir que o putativo retrotransposon do loco *waxy* da linhagem Ast222 é um novo retroelemento. Como o clone $\lambda wx-Ast222$ possui uma sequência com alta identidade ao retrotransposon *PREM2* poder-se-ia suspeitar que a instabilidade do loco *waxy* fosse ocasionada por um retrotransposon deste

tipo, talvez um representante 'quasispecie' da população **PREM2**. Esta ideia está a princípio descartada, pois os transcritos de RNA do **PREM2** somente foram encontrados nos micrósporos das linhagens de milho estudadas (Turcich *et al.*, 1996), enquanto que, a atividade do putativo retrotransposon do loco *waxy* é observada em alta frequência no endosperma. A atividade em pólen também deve ocorrer, como indicado pelos desvios de segregação observados nas progênies da linhagem Ast222. A característica de alta atividade de retrotransposição também distingue o putativo retrotransposon do loco *waxy* da linhagem Ast222 dos demais descritos na literatura. Os retrotransposons de plantas descritos até o momento são muito pouco ativos e somente são ativados sob condições ambientais específicas, como cultura de tecidos e tratamento com metil jasmonato (Grandbastien, 1992; Hirichika, 1997). Para a ativação do putativo retrotransposon da linhagem Ast222 não foi necessária a presença de fatores externos, como os que normalmente ativam os retroelementos de plantas. Observou-se um aumento na frequência de instabilidade somática em plantas F₁(Ast222wx x L222), quando comparadas com as progênies autofecundadas. A capacidade de gerar instabilidade no loco *waxy* permaneceu na geração F₂. Portanto, existe um controle genético da atividade deste putativo novo retrotransposon e não um controle externo da atividade como o comumente observado entre os retrotransposons. Sendo assim, a ideia da existência de algum fator de controle interno deste retrotransposon deve ser considerada.

Sabe-se que um dos principais mecanismos relacionados com a regulação de transposons é o controle do número de cópias. Na família *Ac/Ds* e *Mu* tem sido observado que o aumento no número de cópias do elemento autônomo reduz o número de transposições (Schwartz, 1986). A manutenção de um germoplasma com sucessivas gerações de autofecundação aumenta a homozigose dos locos, além é claro, de aumentar o número de cópias de elemento de transposição ativo. Como

descrito por Schwartz (1986), um aumento de cópias de elemento autônomo pode levar à redução da taxa de mutação. Portanto, em linhagens com alta taxa de endogamia a instabilidade genética poderá ser baixa. A linhagem Ast222 tem sido mantida por autofecundação, este fato poderia estar condicionando a baixa instabilidade genética do loco *waxy*. Avaliando-se o efeito de número de cópias na atividade de transposons e considerando-se a possibilidade de que a instabilidade genética da Ast222 seja devida à presença de um elemento de transposição, seria esperado que em alguns dos cruzamentos da Ast222 a atividade do sistema indutor poderia ser aumentada, pois o número de cópias de um putativo elemento autônomo seria diminuída. No entanto, o aumento da atividade ocorreu apenas no cruzamento da Ast222wx com a linhagem L222. Como esta linhagem é a que deu origem à Ast222, poder-se-ia suspeitar da existência de algum fator complementar do sistema de instabilidade estar presente na L222. A redução do número de cópias ocorreu tanto nos cruzamentos com os parentais como nos cruzamentos com a L477 e L902. No entanto, o aumento da instabilidade no loco *waxy* ocorreu apenas no cruzamento da Ast222wx com a L222. A atividade dos retrotransposons também estaria relacionada com o aumento ou diminuição no número de cópias no genoma como ocorre com os transposons? Ou apenas, este comportamento da linhagem Ast222 é uma questão da característica do próprio sistema indutor de mutações, como ocorre com os transposon *Ac*, *Mu* e *Spm* que nem sempre geram altas frequências de instabilidade em todas as progênes de cruzamentos.

Uma característica de comportamento que aproxima o putativo retrotransposon do loco *waxy* da linhagem Ast222 dos outros retrotransposons descritos é a estabilidade das mutações geradas por ele. Como a retrotransposição é um processo replicativo, espera-se que todos os mutantes gerados por retrotransposição sejam estáveis. A instabilidade somática constantemente observada neste trabalho é de endosperma normal

com setores *wx*. Isto caracteriza então os movimentos de inserção de novas cópias do retrotransposon no alelo *Wx*, gerando assim o aparecimento de clones de células sem amilose. Não foi observado endosperma *wx* com setores normais, que indicaria a excisão do elemento. Portanto, o alelo *wx* com inserção também é estável em tecido somático. O experimento de campo com aproximadamente 1.000 plantas do genótipo *wxwxAe-* originou progênies 100% mutantes, indicando que o alelo *wx* é estável em tecido somático e também germinal. A instabilidade somática constantemente observada neste experimento foi do alelo *Ae* que mutava para *ae*, gerando clones de células com mutação dupla de fenótipo enrugado em endosperma *waxy*. Portanto, a estabilidade foi observada nos alelos *wx* e *ae* da linhagem Ast222, o que indica que estas mutações podem ser geradas pela inserção de um putativo retrotransposon.

Nas progênies da linhagem Ast222 avaliadas nas gerações S7-S10 foram constantemente observados desvios de segregação para os locos *waxy* e *amylose-extender* (Branquinho, 1993). Nestas progênies, o tipo de instabilidade somática mais frequente foi de sementes *wx* com setores enrugados, como o apresentado na Figura 5. Como o fenótipo enrugado é resultante da expressão da dupla mutação nos genes *waxy* e *amylose-extender*, os setores enrugados em endosperma *waxy* são gerados por instabilidade do alelo *Ae*. Embora o gene *amylose-extender* tenha sido clonado em 1993 (Stinard *et al.*), apenas recentemente foi descrita a sua sequência (Kim *et al.*, 1998). O clone da linhagem B73 contendo a sequência do gene *Ae* possui 23.5kb. Na região flanqueadora 3' do gene foi encontrado uma sequência com aproximadamente 350 nucleotídeos que possui 100% de identidade com a início da LTR5' do retrotransposon **PREM2**. Esta mesma sequência também apresentou identidade com os retrotransposons *Ji4*, *Ji3*, *Ji1* e outros. Portanto, na região flanqueadora 3' do gene *Ae* da linhagem B73 existe uma sequência com alta identidade ao elemento **PREM2**. Sequências deste retroelemento também já foram

encontradas em regiões flangeadoras 5' dos genes da poligalacturonosidase, da subunidade A da desidrogenase gliceraldeído fosfato, da chaperonina mitocondrial 60 (Turcich *et al.*, 1996). Na linhagem Ast222wx foi encontrada uma sequência com alta identidade ao retrotransposon **PREM2** ligada a uma sequência que está substituindo a região codificadora do gene *waxy*. A sequência de nucleotídeos com identidade ao **PREM2** que está flangeando o gene *Ae* representa a LTR5' deste retroelemento que é a mesma região encontrada no alelo *wx* da linhagem Ast222. Sequências do **PREM2** dentro de região codificadora de genes ainda não foram descritas na literatura. O fato de se observar constantemente instabilidade nos locos *wx* e *ae* em progênies da linhagem Ast222 sugere que os eventos de instabilidade dos dois locos possam estar associados, talvez pela participação na mesma via biossintética (Branquinho, 1993). As recentes descrições da existência de sequências similares ao retrotransposon **PREM2** nas proximidades dos genes *wx* e *ae* permitem a sugestão de que estas sequências estejam relacionadas com os constantes eventos de instabilidade nos dois locos da linhagem Ast222. A presença das sequências **PREM2** próximas aos genes *wx* e *ae* pode indicar que os eventos de instabilidade estejam relacionados com a inserção deste retroelemento em sequências regulatórias da participação na via biossintética de amido nos genes *wx* e *ae*. Por outro lado, pode ser que as sequências **PREM2** próximas aos genes *wx* e *ae* realizem recombinação homóloga ectópica causando deleção em sequências codificadoras destes genes. Em *Saccharomyces cerevisiae* foi observado que a recombinação homóloga entre elementos *Ty* produzem deleção, inversão e translocação (Boeke, 1989). Neste caso, o elemento de transposição é a sequência homóloga substrato utilizada para as enzimas de recombinação da célula. Ou também, a presença das sequências **PREM2** nas proximidades dos genes *wx* e *ae* pode indicar a ocorrência de inserção deste elemento nos cromossomos 5 e 9 independentemente, como ocorreu com outros genes de

milho citados anteriormente. No caso dos genes da poligalacturonase existe alguma peculiaridade. A família da poligalacturonase possui 12-13 genes e dos 6 genes com a região flanqueadora 5' disponível no GenBank, três possuem sequências **PREM2** idênticas e na mesma posição no gene. Estes resultados sugeriram que talvez a presença do **PREM2** tenha facilitado algumas das duplicações gênicas desta família (Turcich *et al.*, 1996). Esta aparente 'função' do **PREM2**, juntamente com as outras informações da literatura sugerindo que os retroelementos podem fornecer sequências regulatórias para genes, permite suspeitar da associação das sequências **PREM2** com a indução de mutação nos locos *waxy* e *amylose-extender* na linhagem Ast222. Esta suspeita é corroborada pela frequente associação das instabilidades nos locos *wx* e *ae* nas progênies desta linhagem.

Uma outra hipótese que pode ser sugerida para a interpretação de que as sequências do **PREM2** estariam distribuídas por vários locais do genoma de milho é a possibilidade que este retroelemento esteja envolvido com mecanismos de reparo de quebras da fita dupla do DNA. A existência de um mecanismo de reparo de quebras cromossômicas por retrotransposon foi descrito em *Saccharomyces cerevisiae* (Moore & Haber, 1996). Os fragmentos de cDNA das regiões R e U5 da LTR do retrotransposon *Ty1* foram capturadas em sítios de DSB de cromossomos. De maneira semelhante, na linhagem Ast222 poderia ocorrer DSB nas proximidades do loco *waxy*, que seria reparada por sequências do **PREM2**.

Como pode ser verificado, os exemplos citados de rearranjos cromossômicos ocasionados por elementos de transposição estão relacionados com a presença de transposons e não de retrotransposons. Esta associação ocorre porque os mecanismos de rearranjo, em geral, são consequências da excisão do elemento que, por sua vez, envolve DSB. Considerando-se que a retrotransposição é replicativa, dificilmente um retroelemento sairá do local que ele está inserido. Mas cópias do

elemento podem se inserir em outros locais do genoma, para isto ocorrer deverá ser feita uma DSB para que ele possa se integrar no cromossomo. Neste momento, o putativo retrotransposon da linhagem Ast222 poderia dar origem aos eventos de recombinação entre os alelos *Wx* e *wx*. Esta recombinação resultaria em deleção do alelo *Wx* porque o alelo *wx* possui uma região não-homóloga ao alelo *Wx*. Portanto, um putativo retrotransposon ou um elemento do tipo *PREM2*, ou ainda a combinação dos dois, podem estar envolvidos diretamente ou indiretamente com a instabilidade do loco *waxy*. No envolvimento direto, a inserção de um retrotransposon ocasionaria a deleção do alelo *Wx*. Por outro lado, se estes elementos estiverem indiretamente relacionados com a instabilidade, eles poderiam estar causando rearranjo cromossômico. Estes rearranjos ocasionariam a deleção no gene *waxy*. As duas hipóteses do envolvimento de retrotransposons com o mecanismo indutor de mutação existente na linhagem Ast222 devem ser melhor avaliadas. O certo é que de uma forma ou de outra eles poderiam estar relacionados com a instabilidade dos locos *waxy* e *amylose-extender*. Menos provável seria a hipótese de que a instabilidade do loco *wx* da linhagem Ast222 seja ocasionada por um transposon, que no momento da sua excisão causou uma deleção no gene. A não observação da reversão do fenótipo mutante para o normal indica a não excisão do elemento. Ou poderia ser um elemento defectivo, que não se excisa nem na presença do autônomo? Neste caso, teríamos que observar a sequência deste elemento em inserida ao gene *waxy*. No clone *λwx-Ast222* não observa-se qualquer sequência com identidade a transposons.

A maioria dos retrotransposons descritos até o momento, e todos os retrotransposons encontrados no loco *waxy*, foram identificados somente por análises de sequência de DNA. Caso a instabilidade do loco *waxy* seja realmente ocasionada pela inserção de um novo retrotransposon, tem-se a primeira descrição de um retrotransposon não por análise de sequência,

mas sim pela sua capacidade de gerar instabilidade somática. Portanto, esta seria a primeira descrição de que os retrotransposons, como os transposons, são capazes de gerar altas frequências de mutações somáticas e germinal e, conseqüentemente, variabilidade genética.

Dentre os possíveis mecanismos genéticos capazes de gerar instabilidade somática aqui discutidos, os resultados do estudo da linhagem Ast222 não permite concluir que seja um ou outro o mecanismo genético responsável por estes eventos neste germoplasma. No entanto, o estudo molecular da linhagem Ast222 sugere que outros mecanismos, sem a presença de transposons, podem ser responsáveis pelo aparecimento de instabilidade somática em alta frequência. Experimentos visando encontrar novos clones genômicos do gene *waxy* do genótipo Ast222wx seriam de grande utilidade para a caracterizar o mecanismo envolvido com a instabilidade do loco *waxy* da linhagem Ast222. Também a construção de bancos genômicos e busca por recombinantes *waxy* dos genótipos Ast222 normal e L222 poderiam auxiliar na caracterização deste sistema de instabilidade. Plantas derivadas de progênies com instabilidade germinal seriam as mais adequadas para construção desses novos bancos genômicos, porque apresentam novos e recentes eventos de mutação. Análises da expressão por northern blot de um putativo retrotransposon devem ser feitas utilizando a região do clone $\lambda wx-Ast222$ com similaridade à poliproteínas para auxiliar na caracterização da atividade de um putativo retrotransposon, além de avaliar a sua associação com a instabilidade do loco *waxy*.

A ocorrência constante de eventos de instabilidade nos genes *waxy* e *amylose-extender* que atuam na via biossintética do amido do endosperma do milho pode indicar uma relação genética maior entre estes dois genes. A presença, em linhagens distintas, de sequências com alta identidade ao *PREM2* nas regiões flaqueadoras dos genes *waxy* (Ast222) e *amylose-extender* (B73) pode ter um significado genético-evolutivo e não ser

apenas simples eventos ao acaso. Portanto, seria também interessante a caracterização molecular do gene *amylose-extender* da linhagem Ast222 para verificar se neste alelo também existem sequências **PREM2**. O estudo conjunto dos genes *wx* e *ae* poderia trazer informações significativas na caracterização do mecanismo de instabilidade da linhagem Ast222, além de esclarecer porque a instabilidade tem ocorrido sempre nestes dois genes. Estes estudos também poderiam auxiliar no entendimento dos passos envolvidos na via metabólica para formação do amido.

6- Conclusões

Os resultados obtidos para os estudos genético-moleculares da linhagem Ast222 permitem concluir:

- A instabilidade genética dos locos *waxy* e *amylose-extender* foi confirmada no germoplasma Ast222. A mutação nestes locos ocorre na direção do alelo normal para o mutante e não é reversível.

- A instabilidade somática do gene *waxy* resulta em setores mutantes em endosperma normal e pode ocorrer em diversas fases do desenvolvimento do endosperma.

- O mecanismo capaz de induzir mutações neste germoplasma pode ser ativado em cruzamentos da progênie Ast222wx-P147 com a linhagem L222, produzindo frequências elevadas de instabilidade somática no alelo *Wx* da L222. Instabilidade germinal do alelo *Wx* foi confirmada pelo desvio de segregação na progênie F_2 (Ast222wx-P147 x L222).

- A deleção de 8 exons e 7 introns da região codificadora do gene *waxy* nas sublinhagens Ast222 é a responsável pelo fenótipo mutante *waxy*.

- O endosperma mutante *waxy* da linhagem Ast222 não contém mRNA *waxy*.

- A existência de sequências com similaridades a retrotransposons nas proximidades do gene *waxy* nas sublinhagens Ast222wx permite sugerir o envolvimento de um retroelemento na instabilidade da linhagem Ast222. Este

retrotransposon pode estar envolvido diretamente ou indiretamente nos eventos de instabilidade.

7- Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, D.E. & CREECH, R.G. (1977). Breeding special industrial and nutritional types. *In: Corn and Corn Improvement*, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp 363-390.
- ASSAAD, F. & SIGNER, E.R. (1992). Somatic and germinal recombination of a direct repeat in Arabidopsis. *Genetics* 132: 553-566.
- ATHMA, P. & PETERSON, T. (1991). Ac induces homologous recombination at the maize P locus. *Genetics* 128: 163-173.
- BAKER, M.D., READ, L.R., BEATTY, B.G., NG, P. (1996). Requirements for ectopic homologous recombination in mammalian somatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 16(12): 7122-32.
- BELGRADER, P. & MAQUAT, L.E. (1994). Nonsense but not missense mutations can decrease the abundance of nuclear mRNA for the mouse major urinary protein, while both types of mutations can facilitate exon skipping. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6326-6336.
- BIRNSTIEL, M.L, BUSSLINGER, M., STRUB, M. (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in site. *Cell* 41: 349-359.
- BLUME, B., BARRY, C.S., HAMILTON, A.J., BOUZAYEN, M., GRIERSON, D. (1997). Identification of transposon-like elements in non-coding regions of tomato ACC oxidase genes. *Mol. Gen. Gent.* 254: 297-303.
- BOEKE, J.D. & CORCES, V.G. (1989). Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 403-434.
- BRANQUINHO, R.C. (1993). Estudo de um sistema indutor de mutação em milho. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia - UNICAMP - Campinas
- BRINK, R. & NILAN, R. (1952). The relation between light variegated and medium variegated pericarp in maize. *Genetics* 37: 519-544.
- BUREAU, T.E. & WESSLER, S.R. (1992). Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell* 4: 283-1294.
- BUREAU, T.E. & WESSLER, S.R. (1994a). Mobile inverted-repeat elements of the Tourist family are associated with the genes of many cereal grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1411-1415.

- BUREAU, T.E. & WESSLER, S.R. (1994b). Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. Plant Cell 6: 907-916.
- CAMERINI-OTERO, R.D. & HSIEH, P. (1995). Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 29: 509-52.
- CAO, L., ALANI, E., KLECKNER, N. (1990). A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell 61: 1089-1101.
- CAPY, P., LANGIN, T., HIGUET, D., MAURER, P., BAZIN, C. (1997). Do the integrases of LTR-retrotransposons and class II element transposases have a common ancestor? Genetica 100: 63-72.
- CASACUBERTA, J.M., VERNHETTES, S., AUDEON, C., GRANDBASTIEN, M.-A. (1997). Quasispecie in retrotransposon: a role for sequence variability in Tnt1 evolution. Genetica 100: 109-117.
- CASACUBERTA, J.M., VERNHETTES, S., GRANDBASTIEN, M.-A. (1995). Sequence variability within the tobacco retrotransposon Tnt1 population. EMBO J. 14: 2670-2676.
- CHIURAZZI, M., RAY, A., VIRET, J.-F., PERERA, R., WANG, X.-H., LLOYD, A.M., SIGNER, E.R. (1996). Enhancement of somatic intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* by the HO endonuclease. Plant Cell 8: 2057-2066.
- CHOURY, P.S. & NELSON, O.E. (1976). The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunken1* mutations in maize. Biochem. Genet. 14: 1041-1055.
- COEN, E.S., CARPENTER, R., MARTIN, C. (1986). Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. Cell 47: 285-296.
- CORCES, V.G. & GEYER, P.K. (1991). Interactions of retrotransposon with the host genome. Trends Genet. 7: 86-90.
- CRESSE, A.D., HULBERT, S.H., BROWN, W.E., LUCAS, J.R., BENNETZEN, J.L. (1995). Mu1-related transposable elements of maize preferentially insert into low copy number DNA. Genetics 140: 315-322.
- DANG, P.L. & BOYER, C.D. (1989). Comparison of soluble starch synthases and branching enzymes from leaves and kernels of normal and amylose-extender maize. Biochem. Genet. 27: 521-533.

- DAS, O.P., LEVI-MINZI, S., KOURY, M., BENNER, M., MESSING, J. (1990). A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7809-13.
- DAWE, R.K., LACHMANSINGH, A.R., FREELING, M. (1993). Transposon-mediated mutations in the untranslated leader of maize *Adh1* that increase and decrease pollen-specific gene expression. Plant Cell 5: 311-319.
- DEININGER, P.L., BATZER, M.A., HUTCHISON, C.A.III, EDGELL, M.H. (1992). Master genes in mammalian repetitive DNA amplification. Trends Genet. 8: 307-311.
- DIMITRI, P. (1997). Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. Genetica 100: 85-93.
- DOAK, T.G., DOERDER, F.P., JAHN, C.L., HERRICK, G. (1994). A proposed superfamily of transposase genes: transposon like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 942-946.
- DOEBLEY, J.F. (1983). The maize and teosinte male inflorescence: a numerical taxonomic study. Ann. Miss. Bot. Gard. 70: 32-70.
- DOEBLEY, J.F. (1990). Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). Maydica 35: 143-150.
- DOONER, H.K. (1986). Genetic fine structure of the *bronze* locus in maize. Genetics 113: 1021-1036.
- DOONER, H.K. & RALSTON, E. (1990). Effect of the *Mu1* insertion on intragenic recombination at the *bz* locus in maize. Maydica 35: 333-337.
- DOONER, H.K. & MARTINEZ-FÉREZ, I.M. (1997a). Germinal excision of the maize transposon Activator do not stimulate meiotic recombination or homology-dependent repair at the *bz* locus. Genetics 147: 1923-32
- DOONER, H.K. & MARTINEZ-FÉREZ, I.M. (1997b). Recombination occurs uniformly within the *bronze* locus, a meiotic recombination hotspot in the maize genome. Plant Cell 9: 1633-46
- DUARTE, E.A., NOVELLA, I.S., WEAVER, S.C., DOMINGO, E., WAIN-HOBSON, S., CLARKE, D.K., MOYA, A., ELENA, S.F., DE LA TORRE, J.C., HOLLAND, J.J. (1994). RNA virus quasispecie: significance for viral disease and epidemiology. Infect. Agents Dis. 3: 201-214.

- ENGELS, W.R., JOHNSON-SCHLITZ, D.M., EGGLESTON, W.B., SVED, J. (1990). High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. Cell 62: 515-525.
- FEDOROFF, N., WESSLER, S., SHURE, M. (1983). Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. Cell 35: 235-242.
- FEDOROFF, N. (1989). About maize transposable elements. Cell 56: 181-191.
- FINNEGAN, D.J. (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. TIG 5: 103-107.
- FLAVELL, A.J. (1992). Ty1-*cop* group retrotransposons and the evolution of retroelements in the eukaryotes. Genetica 86: 203-214.
- FLAVELL, R.B. (1986). Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. B. Sci. 312: 227-242.
- FOSKET, D.E. (1994). The size and complexity of plant genomes. In: Plant Growth and development: a molecular approach. Academic Press, USA, pp 122-130.
- FUERSTENBERG, S.I. & JOHNS, M.A. (1990). Distribution of Bs1 retrotransposons in *Zea* and related genera. Theor. Appl. Genet. 80: 680-686.
- GABRIEL, A., WILLEMS, M., MULES, E.H., BOEKE, J.D. (1996). Replication infidelity during a single cycle of Ty1 retrotransposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7767-7771.
- GATTI, M. & PIMPINELLI, S. (1992). Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. Annu. Rev. Genet. 26:239-275.
- GIERL, A.R. & SAEDLER, H. (1992). Plant transposable elements and gene tagging. Plant Mol. Biol. 19: 39-49.
- GILBERT, N., ARNAUD, P., LENOIR, A., WARWICK, S.I., PICARD, G., DERAGON, J.M. (1997). Plant S1 SINEs as a model to study retroposition. Genetica 100: 155-160.
- GLOOR, G.B., NASSIF, N.A., JOHNSON-SCHLITZ, D.M., PRESTON, C.R., ENGELS, W.R. (1991). Targeted gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. Science 253: 1110-1117.
- GORLACH, J., RAESECKE, H.R., ABEL, G., WEHRLI, R., AMRHEIN, N., SCHMID, J. (1995). Organ-specific differences in the ratio of alternatively spliced chorismate synthase (LeCS2) transcripts in tomato. Plant J. 8: 451-456.

- GRANDBASTIEN, M.-A., SPIELMANN, A., CABOCHE, M. (1989). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. Nature 337: 376-380.
- GRANDBASTIEN, M.-A. (1992). Retroelements in higher plants. TIG 8: 103-108.
- GRANDBASTIEN, M.-A., AUDEON, C., CASACUBERTA, J.M., GRAPPIN, P., LUCAS, H., MOREAU, C., POUTEAU, S. (1994). Functional analysis of the tobacco Tnt1 retrotransposon. Genetica 93: 181-189.
- GRANDBASTIEN, M.-A., LUCAS, H., MOREL, J., MHIRI, C., VERNHETTES, S., CASACUBERTA, J.M. (1997). The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. Genetica 100: 241-252.
- HESLOP-HARRISON, J.S.(Pat), BRANDES, A., TAKETA, S., SCHMIDT, T., VERSHININ, A.V., ALKHIMOVA, E.G., KAMM, A., DOUDRICK, R.L., SCHWARZACHER, T., KATSIOTIS, A., KUBIS, S., KUMAR, A., PEARCE, S.R., FLAVELL, A.J., HARRISON, G.E. (1997). The chromosomal distributions of Ty1-copia group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. Genetica 100: 197-204.
- HIROCHIKA, H., FUKUCHI, A., KIKUCHI, F. (1992). Retrotransposon families in rice. Mol. Gen. Genet. 233: 209-216.
- HIROCHIKA, H. (1993). Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J. 12: 2521-2528.
- HIROCHIKA, H., SUGIMOTO, K., OTSUKI, Y., TSUGAWA, H., KANDA, M. (1996). Retrotransposon of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7783-7788.
- HIROCHIKA, H. (1997). Retrotransposon of rice: their regulation and use for genome analysis. Plant Mol. Biol. 35: 231-240.
- HU, W., DAS, P.O., MESSING, J. (1995). Zeon-1, a member of a new maize retrotransposon family. Mol. Gen. Genet. 248: 471-480.
- JACOBSON, A. (1996). Poly(A) metabolism and translation: The closed-loop model. *In*: Translation Control, J.W.B. Hershey, M.B. Mathews, and N. Sonenberg, eds . Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 451-480.
- JOHNS, M.A., MOTTINGER, J., FREELING, M. (1985). A low copy number, copia-like transposon in maize. EMBO J. 4: 1093-1102.

- JIN, Y. & BENNETZEN, J.L. (1989). Structure and coding properties of Bs1, a maize retrovirus-like transposon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6235-6239.
- JIN, Y. & BENNETZEN, J.L. (1994). Integration and nonrandom mutation of a plasma membrane proton ATPase gene fragment within the Bs1 retroelement of maize. Plant Cell 6: 1177-1186.
- KIMURA, M. (1977). Preponderance of synonymous changes as evidence for the neutral theory of molecular evolution. Nature 267: 275-276.
- KLÖSGEN, R.B., GIERL, A., SCHWARZ-SOMMER, Z., SAEDLER, H. (1986). Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*. Mol. Gen. Genet. 203: 237-244.
- KNOOP, V., UNSELD, M., MARIEBFELD, J., BRANDT, P., SUNKEL, S., ULLRICH, H., BRENNICKE, A. (1996). Copia, gypsy and LINE-like retrotransposon fragments in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 142: 579-585.
- KOBAYASHI, I. (1992). Mechanisms for gene conversion and homologous recombination: The double-strand break repair and the successive half crossing over model. Adv. Biophys 28: 81-133.
- KONIECZNY, A., VOYTAS, D.F., CUMMINGS, M.P., AUSUBEL, F.M. (1991). A superfamily of *Arabidopsis thaliana* retrotransposon. Genetics 127: 801-809.
- KOPRIVA, S., COSSU, R., BAUWE, H. (1995). Alternative splicing results in two different transcript for H-protein of the glycine cleavage system in the C₄ species *Flaveria trinervia*. Plant J. 8: 435-441.
- KUMAR, A., PEARCE, S.R., McLEAN, K., HARRISON, G., HESLOP-HARRISON, J.S., WAUGH, R., FLAVELL, A.J. (1997). The Ty1-*copia* group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. Genetica 100: 205-217.
- LEETON, P.R.J. & SMYTH, D.R. (1993). An abundant LINE-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum*. Mol. Gen. Genet. 237: 97-104
- LENOIR, A., COURNOYER, B., WARWICK, S., PICARD, G., DERAGON, J.-M. (1997). Evolution of the SINE S1 retrotransposons in Cruciferae plant species. Mol. Biol. Evol. 14: 934-941.
- LI, X. & NOLL, M. (1994). Evolution of distinct developmental functions of three *Drosophila* genes by acquisition of different *cis*-regulatory regions. Nature 367: 83-87.

- LIU, J., WU, T.-C., LICHTEN, M. (1995). The location and structure of double-strand DNA breaks induced during yeast meiosis: Evidence for a covalently linked DNA-protein intermediate. EMBO J. 14: 4599-4608.
- LOWE, B., MATHERN, J., HAKE, S. (1992). Active *Mutator* elements suppress the mutant phenotype and increase recombination at the *Kn1-O* tandem duplication. Genetics 132: 813-822.
- MANNINEN, I. & SCHULMAN, H. (1993). BARE-1, a *copia*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Mol. Biol. 22: 829-846.
- MATHERN, J. & HAKE, S. (1997). Mu element-generated gene conversions in maize attenuate the dominant knotted phenotype. Genetics 147: 305-314
- MARILLONNET, S. & WESSLER, S.R. (1997). Retrotransposon insertion into the maize *waxy* gene results in tissue-specific RNA processing. Plant Cell 9: 967-978.
- MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J., GARCÍA-MARTÍNEZ, J., VICIENT, C. M. (1997). What makes *Grande1* retrotransposon different? Genetica 100: 15-28.
- McCLINTOCK, B. (1951). Mutable loci in maize. Carnegie Inst. Washington Year Book 50: 174-188.
- McCLINTOCK, B. (1938). The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. Missouri Agricult. Exp. Station Res. Bull 290: 1-48.
- McCLINTOCK, B. (1946). Maize genetics. Carnegie Inst. Washington Yearbook 45: 176-186.
- McCLINTOCK, B. (1948). Mutable loci in maize. Carnegie Inst. Washington Yearbook 47: 155-169.
- McCLINTOCK, B. (1956). Controlling elements and the gene. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 21: 197-216.
- McCLINTOCK, B. (1964). Aspects of gene regulation in maize. Carnegie Inst. Washington Yearbook 63: 592-602.
- McDONALD, J.F. (1990). Macroevolution and retroviral elements. BioScience 40: 183-191.
- McDONALD, J.F., MATYUNINA, L.V., WILSON, S., JORDAN, I.K., BOWEN, N.J., MILLER, W.J. (1997). LTR retrotransposons and the evolution of eukaryotic enhancers. Genetica 100: 3-13.

- MESELSON, M.S. & RADDING, C.M. (1975). A general model for genetic recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 358-361.
- MILLER, W.J., PARICIO, N., HAGEMANN, S., MARTINEZ-SEBASTIAN, M.J., PINSKER, W., de FRUTOS, R. (1995). Structure and expression of clustered P element homologues in *Drosophila subobscura* and *Drosophila guanche*. Gene 156: 167-174.
- MILLER, W.J., McDonald, J.F., PINSKER, W. (1997). Molecular domestication of mobile elements. Genetica 100: 261-270.
- MOORE, J.K., LUCAS, H., BATTY, N., FLAVELL, R. (1991). A family of retrotransposon and associated genomic variation in wheat. Genomics 10: 461-468.
- MOORE, J.K. & HABER, J.E. (1996). Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. Nature 383: 644-646.
- MURRAY, M.G., CUELLAR, R.E., THOMPSON, W.E. (1978). DNA sequence organization in the pea genome. Biochemistry 18: 5781-5790.
- MYERS, R.S., STAHL, F.W. (1994). Chi and the RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. Annu. Rev. Genet. 28: 49-70.
- NASSIF, N., PENNEY, J., PAL, S., ENGELS, W.R., GLOOR, G.B. (1994). Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. Mol. Cell. Biol. 14: 1613-1625.
- NELSON, O. (1976). Previously unreported *wx* heteroalleles. Maize Genet. Coop. Newslett. 50: 109-113.
- NICKOLOFF, J.A., CHEN, E.Y.C., HEFFRON, F. (1986). A 24-bases-pair DNA sequence from the *MAT* locus stimulates intergenic recombination in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7831-7835.
- NOMA, K., NAKAJIMA, R., OHTSUBO, H. (1997). **RIRE1**, a retrotransposon from wild rice *Oryza australiensis*. Genes Genet. Syst. 72: 131-140.
- OSMAN, F. & SUBRAMANI, S. (1998). Double-strand break-induced recombination in eukaryotes. Prog. in Nuc. Acid Res. and Mol. Biol. 58: 263-299.
- PALMGREN, M.G. (1994). Capturing of host DNA by a plant retroelement: **BsI** encodes plasma membrane H⁺-ATPase domains. Plant Mol. Biol. 25: 137-140.

- PANSTRUGA, R., BÜSCHGES, R., PIFFANELLI, P., SCHULZE-LEFERT, P. (1998). A contiguous 60kb genomic stretch from barley reveals molecular evidence for gene islands in a monocot genome. Nucleic Acids Research 26: 1056-1062.
- PARDUE, M.L., DANILEVSKAYA, O.N., TRAVERSE, K.L., LOWENHAUPT, K. (1997). Evolutionary links between telomeres and transposable elements. Genetica 100: 73-84.
- PEARCE, S.R., PICH, U., HARRISON, G., FLAVELL, J.A., HESLOP-HARRISON, J.S.(PAT), SCHUBERT, I., KUMAR, A. (1996). The Ty1-*copia* group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. Chromosome Research 4: 357-364.
- PÉLISSIER, T., TUTOIS, S., DERAGON, J.M., TOURMENTE, S., GENESTIER, S., PICARD, G. (1995). *Athila*, a new retroelement from *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 29: 441-452.
- PÉLISSON, A., TEYSSET, L., CHALVET, F., KIM, A., PRUD'HOMME, N., TERZIAN, C. (1997). About the origin of retroviruses and the co-evolution of the *gypsy* retrovirus with the *Drosophila flamenco* host gene. Genetica 100: 29-37.
- PEREIRA, A., SCHWARZ-SOMMER Zs., GIERL, A., BERTRAM, T., PETERSON, P.A., SAEDLER, H. (1985). Genetic and molecular analysis of the Enhancer (En) transposable element system of *Zea mays*. EMBO J. 4: 17-23.
- PETERSON, P.A. (1980). Instability among the components of a regulatory element transposon in maize. Cold Spring Symp. Quant. Biol. 45: 447-455.
- PLASTERK, R.H.A. & GROENEN, J.T.M. (1992). Targeted alterations of the *Caenorhabditis elegans* genome by transgene instructed DNA double strand break repair following Tc1 excision. EMBO J. 11: 287-290.
- POUTEAU, S., SPIELMANN, A., MEYER, C., GRANDBASTIEN, M.-A., CABOCHE, M. (1991). Effects of Tnt1 tobacco retrotransposon insertion on target gene transcription. Mol. Gen. Genet. 228: 233-239.
- PUCHTA, H., DUJON, B., HOHN, B. (1996). Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. Nuc. Acids Res. 21: 5034-40.
- PULAK, R., & ANDERSON, P. (1993). mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. Genes Dev. 7: 1885-1897.
- PURUGGANAN, M. & WESSLER, S.R. (1994). Molecular evolution of *magellan*, a maize Ty3/*gypsy*-like retrotransposon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11674-11678.

- RAY, A., SIDDIQI, I., KOLODKIN, A.L., STAHL, F.W. (1988). Intrachromosomal gene conversion induced by a DNA double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 201: 247-260.
- ROBINS, D.M. & SAMUELSON, L.C. (1996). Mechanisms of retroviral mutation. Trends Microb. 4: 16-21.
- ROTHNIE, H.M., McCURRACH, K.J., GLOVER, L.A., HARDMAN, N. (1990). Retrotransposon-like nature of Tp1 elements: implication for the organization of highly repetitive, hypermethylated DNA in the genome of *Physarum polycephalum*. Nucleic Acids Res. 19: 279-286.
- RUDIN, N. & HABER, J.E. (1988). Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. Mol. Cell. Biol. 8:3918-3928.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SANMIGUEL, P., TIKHONOV, A., JIN, Y., MOTCHOULSKAIA, N., ZAKHAROV, D., MELAKE-BERHAN, A., SPRINGER, P.S., EDWARDS, K.J., LEE, M., AVRAMOVA, Z., BENNETZEN, J.L. (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize. Science 274: 765-768.
- SCHWARTZ, D. (1986). Analysis of the autonomous wx-m7 transposable element mutant of maize. Maydica 121: 125-128.
- SCHWARZ-SOMMER, Z., GIERL, A., CUYPERS, H., PETERSON, A., SAEDLER, H. (1985). Plant transposable elements generate the DNA sequence diversity needed in evolution. EMBO Journal 4: 591-597.
- SCHWARZ-SOMMER, Z., LECLERCQ, L., GOBEL, E., SAEDLER, H. (1987). Cin4, an insert altering the structure of the Al gene in *Zea mays*, exhibits properties of non-viral retrotransposons. EMBO J. 6: 3873-3880.
- SHALEV, G. & LEVY, A.A. (1997). The maize element Ac induces recombination between the donor site and an homologous ectopic sequence. Genetics 146: 1143-1151.
- SHANNON, J.C. & CREECH, R.G. (1977). Genetics of storage polyglucosides in *Zea mays* L. Annals New York Academy of Sciences. pp: 279-289.
- SHCHERBAN, A.B. & VERSHININ, A.V. (1997). BARE-ID, a representative of a family of BARE-like elements of the barley genome. Genetica 100: 231-240.

- SHURE, M., WESSLER, S., FEDOROFF, N. (1983). Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize. Cell 35: 225-233.
- SKALKA, A.M. & GROFF, S.P. (1993). Reverse Transcriptase. Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.
- SMYTH, D.R., KALITSIS, P., JOSEPH, J.L., SENTRY, J.W. (1989). Plant retrotransposon from *Lilium henry* is related to Ty3 of yeast and the *gypsy* group of *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5015-5019.
- STINARD, P.S., ROBERTSON, D.S., SCHNABLE, P.S. (1993). Genetic isolation, cloning and analysis of a Mutator-induced, dominant antimorph of the maize *amylose-extender* locus. Plant Cell 5: 1555-1566.
- STRATHERN, J.N., KLAR, A.J., HICKS, J.B., ABRAHAM, J.A., IVY, J.M., NASMYTH, K.A., MCGILL, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the *MAT* locus. Cell 31: 183-192.
- SUN, H., TRECO, D., SCHULTES, N.P., SZOSTAK, J.W. (1989). Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. Nature 338: 87-90.
- TAKATA, M., SASAKI, M.S., SONODA, E., MORRISON, C., HASHIMOTO, M., UTSUMI, H., YAMAGUCHI-IWAI, Y., SHINOHARA, A., TAKEDA, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. EMBO J. 17: 5497-5508.
- TAKEDA, S., SUGIMOTO, K., OTSUKI, H., HIROCHIKA, H. (1998). Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon *Tto1* by wounding and methyl jasmonate. Plant Mol. Biol. 36: 365-376.
- TEMIN, H. (1981). Structure, variation and synthesis of retrovirus long terminal repeat. Cell 27: 1-3.
- TENG, S.-C., KIM, B., GABRIEL, A. (1996). Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. Nature 383: 641-44.
- THYKJAER, T., DANIELSEN, D., SHE, Q., STOUGAARD, J. (1997). Organization and expression of genes in the genomic region surrounding the glutamine synthetase gene *Gln1* from *Lotus japonicus*. Mol. Gen. Genet. 255: 628-636.
- TURCICH, M.P. & MASCARENHAS, J.P. (1994). PREM-1, a putative maize retroelement has LTR (long terminal repeat) sequences that are preferentially transcribed in pollen. Sex. Plant Reprod. 7: 2-11.

- TURCICH, M.P., BOKHARI-RIZA, A., HAMILTON, D.A., HE, C., MESSIER, W., STEWART, C., MASCARENHAS, J.P. (1996). PREM-2, a copia-type retroelement in maize is expressed preferentially in early microspores. Sex. Plant Reprod. 9: 65-74.
- VAUCHERET, H., MARION-POLL, MEYER, C., FAURE, J.D., MARIN, E., CABOCHE, M. (1992). Interest in and limits to the utilization of reporter genes for the analysis of transcriptional regulation of nitrate reductase. Mol. Gen. Genet. 245: 259-268.
- VARAGONA, M.J., PURUGGANAN, M., WESSLER, S.R. (1992). Alternative splicing induced by insertion of retrotransposons into maize waxy gene. Plant Cell 4: 811-820.
- VARMUS, H.E. (1983). Retroviruses. *In: Mobile Genetic Elements*. Academic Press, USA. pp 411-503.
- VERNHETTES, S., GRANDBASTIEN, M.-A., CASACUBERTA, J.M. (1997). *In vivo* characterization of transcriptional regulatory sequences involved in the defence-associated expression of the tobacco retrotransposon Tnt1. Plant Mol. Biol. 35: 673-679.
- VICIENT, C.M. & MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J.A. (1997). Discovery of a Zdel transposable element in *Zea* species as a consequence of a retrotransposon insertion. Gene 184: 257-261.
- VOYTAS, D.F., CUMMINGS, M.P., KONIECZNY, A., AUSUBEL, F.M. RODERMEL, S. (1992). *copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7124-7128.
- ZOU, S. & VOYTAS, D. (1997). Silent chromatin determines target preference of the *Saccharomyces* retrotransposon Ty5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7412-7416.
- WANG, S., ZHANG, Q., MAUGHAN, P.J., MAROOF, M.A.S. (1997). *copia*-like retrotransposons in rice: sequence heterogeneity, species distribution and chromosomal locations. Plant Mol. Biol. 33: 1050-1058.
- WECK, E., COURAGE, U., DÖRING, H.-P., FEDOROFF, N.V., STARLINGER, P. (1984). Analysis of *sh-m6233*, a mutation induced by the transposable element Ds in the sucrose synthase gene of *Zea mays*. EMBO J. 3:1713-1716.
- WEIL, C.F. & WESSLER, S.R. (1990). The effects of plant transposable element insertion on transcription initiation and RNA processing. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 527-552.

- WEIL, C.F. & WESSLER, S.R. (1993). Molecular evidence that chromosome breakage by Ds elements is caused by aberrant transposition. Plant Cell 5: 515-522.
- WEINER, A.M., DEININGER, P.L., EFSTRATIADIS, A. (1986). Nonviral retroposons: genes, pseudogenes and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. Annu. Rev. Biochem. 55: 631-661.
- WESSLER, S.R. (1988). Phenotypic diversity mediated by the maize transposable elements Ac e Spm. Science 242: 399-405.
- WESSLER, S.R. (1996). Plant retrotransposons: turned on by stress. Current Biology 6: 959-961.
- WESSLER, S.R., BARAN, G., VARAGONA, M., DELLAPORTA, S.L. (1986). Excision of Ds produces waxy proteins with a range of enzymatic activities. EMBO Journal 5: 2427-2432.
- WESSLER, S.R., BUREAU, T.E., WHITE, S.E. (1995). LTR-retrotransposons and MITES: important players in the evolution of plant genomes. Curr. Opin. Genet. Devel. 3: 878-821.
- WESSLER, S.R. & VARAGONA, M.J. (1985). Molecular basis of mutations at the *waxy* locus of maize: correlation with the fine structure genetic map. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4177-4181.
- WHITE, S.E., HABERA, L.F., WESSLER, S.R. (1994). Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11792-11796.
- WRIGHT, D.A., KE, N., SMALLE, J., HAUGE, B.M., GOODMAN, H.M., VOYTAS, D.F. (1996). Multiple non-LTR retrotransposons in the genome of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 142: 569-578.