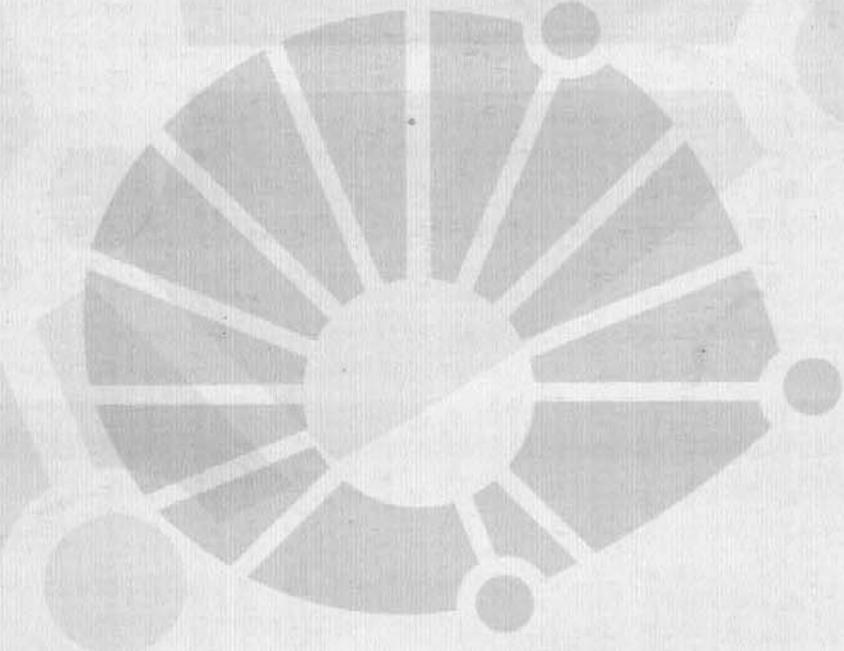


# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**BC/39421**  
**IB/81448**



UNICAMP

## INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

G585



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

**Sandra Martha Gomes Dias**

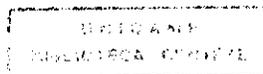
IDENTIFICAÇÃO, CLONAGEM, ESTRUTURA E TRANSCRIÇÃO DO LOCO  
GÊNICO MITOCONDRIAL *nad3-rps12*  
DE  
*Coix lacryma - jobi L.*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Sandra Martha Gomes Dias e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do **título de Mestre em Genética e Biologia Molecular**. Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Anete Pereira de Souza

1999



111761

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	G585i
V.	39421
	229/99
	X
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	09/11/99
N.º CPO	

CM-00136852-2

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

**Gomes Dias, Sandra Martha**

**G585i** Identificação, clonagem, estrutura e transcrição do loco gênico mitocondrial *nad3-rps12* de *Coix lacryma-jobi* L./ Sandra Martha Gomes Dias.- Campinas, SP: [s.n.], 1999. 182f: ilus.

Orientadora: Anete Pereira de Souza  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

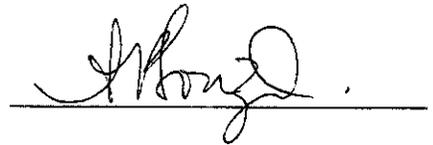
1. DNA mitocondrial plantas. 2. Genes. 3. Edição (genética).  
I. Souza, Anete Pereira de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Campinas, 09 de setembro de 1999**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Titulares**

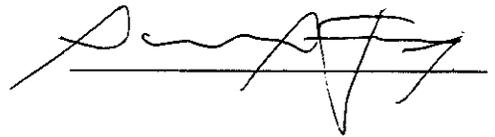
Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)

Handwritten signature of Anete Pereira de Souza in cursive script, written above a horizontal line.

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

Handwritten signature of Yoko Bomura Rosato in cursive script, written above a horizontal line.

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Handwritten signature of Marcelo Menossi Teixeira in cursive script, written above a horizontal line.

**Suplente**

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin

A blank horizontal line intended for the signature of the substitute member.

*Dedico,*

*Aos meus pais,  
que me ensinaram o caminho que hoje sigo*

*Aos meus irmãos,  
sinônimos de apoio, incentivo.*

*À minha sobrinha que acaba de nascer  
(e me faz lembrar que estou ficando para titia...)*

*Ao Luciano*  
*amigo-namorado-companheiro*

*Aos meus sempre-amigos,  
que carrego no coração,  
e dos quais me faço,  
Denis,  
Lara,  
Pedro Henrique,  
Rachel,  
Shirley  
e Tatiana,*

*Aos meus amigos que me acolheram  
André,  
Júlio  
e Alexandre*

*À minha orientadora, Anete,  
que me ensinou a fazer e admirar a ciência*

*À todos do Lab.de Análise Genética e Molecular, antigo Lab de RFLP, do qual faço parte há quatro anos, o qual vi crescer, no qual me sinto em casa.*

*À Susy, companheira de Mestrado, ajuda fundamental nos primeiros momentos do trabalho.*

*Ao Sibov, sempre prestativo (pelo menos na parte da tarde).*

*Ao Rogério, amigo querido, companheiro de bandejão.*

*À Milena, Marlene, Claudete, Luciana pelo carinho, fofocas, cafezinhos com bolachas.*

*À Heloísa, Carolina pelo apoio técnico, humano, pela alegria.*

*Ao Alexandre, Adelmo, Paulo*

*À Prianda, Karine, Andréia,*

*aluno(a)s recentes que só fazem aumentar o ambiente amigo do laboratório.*

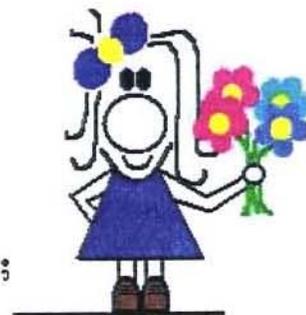
*À Zildinha pela ajuda imprescindível no suporte do trabalho,  
pelos cafezinhos sempre no ponto,  
pelo sorriso.*

*Aos componentes da pré-banca e banca de defesa, Prof Yoko  
Bomura Rosato, Prof. Márcio de Castro Silva Filho, Prof  
Ana Maria Lima de Azeredo Espin e Prof Marcelo Menossi  
Teixeira pela disponibilidade e interesse em colaborar com este  
trabalho.*

*À FAPESP e FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto  
(FAPESP-Proj. n° 0012/96- FAPESP-Proj. n° 96/03520-8)  
À FAPESP pela Bolsa de Iniciação Científica (Processo n°  
96/0540-8) e de Mestrado MSJ e MSJI (Processo n°  
97/018040-8) a mim concedidas.*

**À TODOS QUE DE UMA FORMA OU DE  
OUTRA ESTIVERAM PRESENTES NA  
EXECUÇÃO DESTA OBRA.**

Se for pra esquentar, que seja no sol ;  
Se for pra enganar, que seja o estomago ;  
Se for pra chorar, que se chore de alegria ;  
Se for pra mentir, que seja a idade ;  
Se for pra roubar, que se roube um beijo ;  
Se for pra perder, que se perca o medo ;  
Se for pra cair, que seja na ganhaia ;  
Se existe guerra, que seja de travessieiros ;  
Se existe fome, que seja de amor ;  
Se for pra ser feliz, que seja o tempo todo !!!!!



## ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO</b> -----	1
<b>ABSTRACT</b> -----	3
<b>1. INTRODUÇÃO</b> -----	4
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> -----	7
2.1. Organização do DNAm de plantas superiores -----	7
2.2. Genes mitocondriais -----	11
2.2.1. Genes presentes no DNAm das plantas superiores -----	11
2.2.2. Introns mitocondriais -----	17
2.2.3. Edição -----	18
2.2.4. Transcrição dos genes mitocondriais de plantas superiores -----	24
2.2.5. Promotores de genes mitocondriais de plantas superiores: sequência e atividade transcricional -----	26
2.2.6. Processamento dos transcritos mitocondriais de plantas superiores -----	28
2.2.6.1. rRNA -----	29
2.2.6.2. mRNA -----	31
2.2.6.3. tRNA -----	32
2.3. DNAm de <i>Marchantia polymorpha</i> -----	33
2.4. Características evolutivas do genoma mitocondrial de plantas -----	35
2.5. Estratégias para a descoberta de novos genes mitocondriais -----	37
2.6. Estratégia utilizada neste trabalho para a descoberta de novos genes mitocondriais -----	39
<b>3. OBJETIVOS</b> -----	41
<b>4. MATERIAL</b> -----	42
4.1. Material vegetal -----	42
4.2. Oligonucleotídeos -----	43
4.3. Sondas-----	43
<b>5. MÉTODOS</b> -----	47
5.1. Escolha das <i>orfs</i> de <i>M. polymorpha</i> hibridizadas com o DNAm de diferentes espécies vegetais -----	47
5.2. Desenho dos oligonucleotídeos -----	47
5.3. Extração de DNAm -----	48
5.4. Extração de DNAct-----	51
5.5. Extração de DNA total de <i>Marchantia chenopoda</i> -----	53
5.6. Extração de RNAm -----	54
5.6.1. Tratamento do RNAm com DNase livre de Rnase -----	57
5.7. Quantificação do DNA -----	58
5.8. Reações de PCR -----	58
5.8.1. Amplificação de DNA -----	58
5.8.2. Amplificação de cDNAs -----	60
5.8.2.1. Amplificação sem "Hot Start" -----	61

5.8.2.2. Amplificação com "Hot Start" -----	61
5.9. Purificação do DNA após eletroforese -----	63
5.9.1. Centrifugação -----	63
5.9.2. Eletroeluição -----	64
5.9.3. Colunas de purificação ("kit" QIAEX II, Gel Extraction kit - Qiagen) -	65
5.10. Hibridização radioativa -----	66
5.10.1. Transferência do DNA para membranas de "Nylon" -	
"Southern blotting"-----	66
5.10.2. Transferência do RNA para membranas de "Nylon" -	
"Northern blotting" -----	67
5.10.3. Marcação radioativa das sondas (Kit Prime-a-Gene/ Promega) -----	70
5.10.4. Separação dos nucleotídeos não incorporados -----	71
5.10.5. Medida da incorporação da radioatividade -----	72
5.10.6. Hibridização do DNA -----	72
5.10.6.1. Hibridização em baixa estringência -----	73
5.10.6.2. Hibridização do DNA em alta estringência -----	74
5.10.7. Hibridização do RNA -----	75
5.11. Clonagem de insertos em plasmídeos -----	75
5.12. Obtenção de células competentes -----	77
5.13. Transformação de bactérias -----	78
5.13.1. Preparo de estoque de bactérias transformadas em placas de micro	
título -----	79
5.13.2. Preparo de estoque de bactérias transformadas em tubos de 2ml -----	79
5.14. Extração de plasmídeos -----	80
5.14.1. Lise alcalina I -----	80
5.14.2. Lise alcalina II -----	81
5.14.3. "Boiling" -----	81
5.15. Verificação dos clones recombinantes -----	82
5.16. Sequenciamento -----	83
5.16.1. Preparo do DNA utilizado -----	83
5.16.2. Reação de sequenciamento -----	84
5.16.2.1. "Kit Thermo Sequenase" (Amersham) -----	84
5.16.2.2. "Kit Big Dye Terminator" (Perkin Elmer) -----	85
5.17. Análises da sequência de bases -----	86
5.18. Síntese de cDNA -----	86
5.18.1. Purificação de cDNA -----	87
5.18.2. Síntese de cauda poli-A -----	87

<b>6. RESULTADOS</b> .....	88
6.1. <b>1º ETAPA:</b> Estudo da conservação de diferentes <i>orfs</i> do DNAm <sub>t</sub> de <i>M. polymorpha</i> no DNAm <sub>t</sub> de plantas superiores .....	88
6.1.1. Extrações de DNAm <sub>t</sub> , DNAct e DNA total de <i>M. chenopoda</i> .....	88
6.1.1.1. DNAm <sub>t</sub> e DNAct .....	88
6.1.1.2. DNA total de <i>M. chenopoda</i> .....	91
6.1.2. Amplificação das <i>orfs</i> do DNAm <sub>t</sub> de <i>M. polymorpha</i> .....	91
6.1.3. Hibridizações .....	92
6.1.3.1. Hibridização do fragmento correspondente à <i>orf86a</i> .....	96
6.1.3.2. Hibridização do fragmento correspondente à <i>orf99</i> .....	96
6.1.3.3. Hibridização do fragmento correspondente à <i>orf109</i> .....	97
6.1.3.4. Hibridização do fragmento correspondente à <i>orf136</i> .....	98
6.1.3.5. Hibridização do fragmento correspondente à <i>orf167</i> .....	98
6.1.3.6. Hibridização do fragmento correspondente à <i>orf207</i> .....	99
6.2. <b>2º ETAPA:</b> Estudo de estrutura do fragmento do DNAm <sub>t</sub> de coix homólogo à <i>orf167</i> .....	100
6.2.1. Hibridização da <i>orf 167</i> com as membranas 6Mp e 7Mp .....	100
6.2.2. Clonagem do fragmento de 1,4 kb <i>Bgl II / Bgl II</i> homólogo a <i>orf167</i> de <i>M. polymorpha</i> (clone A8) .....	102
6.2.3. Construção do Mapa de Restrição do clone A8 e identificação da região de homologia com a <i>orf167</i> de <i>M. polymorpha</i> .....	105
6.2.4. Subclonagem .....	109
6.2.4.1. Clonagem do subclone 1 .....	109
6.2.4.2. Verificação da conservação do fragmento de 500 pb <i>Spe I / Pvu II</i> (subclone 1) no DNAm <sub>t</sub> de outras espécies de plantas superiores .....	112
6.2.4.3. Clonagem dos subclone 2, subclone 3, subclone 4 e subclone 5 .....	115
6.2.5. Sequenciamento dos subclones .....	115
6.2.6. Comparação do clone de 1,4 kb <i>Bgl II / Bg III</i> com seqüências do banco .....	116
6.2.7. Clonagem da <i>orf 167</i> de <i>M. polymorpha</i> de dados .....	120
6.2.8. Verificação se a <i>orf167</i> de <i>M. polymorpha</i> reconhece o gene <i>nad3</i> e o pseudo-tRNA no DNAm <sub>t</sub> de outras espécies vegetais .....	124
6.3. <b>3º ETAPA:</b> Estudo de transcrição do fragmento do DNAm <sub>t</sub> de coix homólogo à <i>orf167</i> .....	126
6.3.1. Estudo da transcrição dos genes presentes no fragmento de 1,4 kb <i>Bgl II / Bgl II</i> do DNAm <sub>t</sub> de coix .....	126
6.3.2. Síntese e análises dos cDNA .....	132
6.3.2.1. Sequenciamento da porção final do gene <i>rps12</i> .....	135
6.3.2.2. Síntese dos cDNA, clonagem e sequenciamento .....	137
6.3.2.2.1. cDNA do "cluster" <i>nad3-rps12</i> obtido pela combinação dos oligonucleotídeos <i>fnad3/drps12</i> e <i>dnad3/drps12</i> .....	137
6.3.2.2.2. Mapeamento da região 5' do transcrito dos genes <i>nad3-rps12</i> .....	141
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	147
7.1. Existe alguma correlação entre a <i>orf167</i> e o gene <i>nad3</i> ? .....	147
7.2. A conservação do loco tRNA <sup>Ser</sup> /pseudo-tRNA/ <i>nad3/rps12</i> entre monocotiledôneas .....	149
7.3. Edição do mRNA dos genes <i>nad3</i> e <i>rps12</i> em plantas superiores .....	154

<b>8. CONCLUSÃO</b>	-----	163
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	-----	164
<b>10. BIBLIOGRAFIA CITADA</b>	-----	165

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

### FIGURAS

- ◆ Figura 1: Esquema representando o maquinário de síntese protéica mitocondrial. Verifica-se que, mesmo possuindo seu próprio maquinário de síntese, a mitocôndria ainda necessita de proteínas e tRNAs importados do citossol para o seu funcionamento (Alberts et al., 1994)-----13
- ◆ Figura 2: Esquema da árvore filogenética da possível evolução da mitocôndria, do cloroplasto e de seus ancestrais bacterianos (Alberts et al., 1994).-----36
- ◆ Figura 3: Mapa físico do DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha* (Oda et al., 1992). As *orf 86a*, *99*, *109*, *136*, *167* e *207* estão indicadas por setas.-----46
- ◆ Figura 4: A: Gel que originou a membrana 2Mp e que contém o DNAm<sub>t</sub>, digerido com *Bam HI* e migrado através de eletroforese, de sete espécies de angiospermas: alfafa (alf), batata (bat), DNA cloroplastidial de coix (coix ct), DNA mitocôndrial de coix (coix mt), couve-flor (c.f), ervilha (erv), milho e soja. B-G: Resultado da hibridização com a *orf86a* (B), *orf99* (c), *orf109* (D), *orf136* (E), *orf167* (F) e *orf207* (G). M: marcador ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*). M.C.: DNA total de *M. chenopoda* presente em uma membrana hibridizada juntamente com a 2Mp.-----94
- ◆ Figura 5: Géis que deram origem às membranas 6Mp (A) e 7Mp (B) após eletroforese do DNAm<sub>t</sub> de coix digerido com várias enzimas, e as respectivas autoradiografias obtidas através da hibridização das membranas com a *orf167*. M: marcador de peso molecular ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*). Indicado por seta está o fragmento de 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*, homólogo a *orf167*, que foi isolado e clonado.-----101

- ◆ Figura 6: Géis que originaram as membranas Gel1 (A) e Gel2 (B), as quais contém o produto de amplificação por PCR de 72 clones do banco subgenômico de coix, migrados através de eletroforese. Ao lado de cada foto de gel, os resultados autoradiográficos da hibridização da respectiva membrana com a *orf167*. M: marcador de peso molecular ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*). Indicado por setas estão os clones positivos A8 e E11.-----103
- ◆ Figura 7 A: Gel contendo o DNAm<sub>t</sub> de coix digerido com as enzimas especificadas, e o clone A8, migrados através de eletroforese. B e C: autoradiografias resultantes da hibridização da membrana "Coix-clone" com a *orf167* (B), e com o clone A8 (C). M: marcador de peso molecular ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*). -----106
- ◆ Figura 8: Eletroforese em gel de agarose do clone A8 digerido com diferentes enzimas de restrição. *Hind III* e *Sst I* são digestões controle (liberam o inserto inteiro). M: marcador de peso molecular ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*)-----107
- ◆ Figura 9: Géis que deram origem às membranas "Mapa de Restrição I" (A) e "Mapa de Restrição II" (B). Ao lado de cada foto do gel estão as autoradiografias obtidas após hibridização da *orf167* com as membranas. *Hind III* e *Sst I* são digestões controle (liberam o inserto inteiro). M: marcador de peso molecular( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*)-110
- ◆ Figura 10: Mapa de restrição indicando (fora de escala) os sítios de restrição presentes no clone 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* e no "polilynker" do plasmídeo perto da região de clonagem. Os 5 subclones obtidos são indicados: Sub1, Sub2, Sub3, Sub4 e Sub5. O Sub 1 (barra em vermelho) possui a região de homologia à *orf167*, a qual está também evidenciada em vermelho no clone 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*.-----111

- ◆ Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos subclones 1 a 5 após digestão com enzimas que liberam o inserto. M: marcador de peso molecular ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*)-----113
- ◆ Figura 12 A: Gel contendo o DNAm das espécies especificadas digeridos com *Bam HI*. B: Autoradiografia mostrando o resultado da hibridização do fragmento 0,5 kb *Pvu II* / *Spe I* (Sub1) com a membrana originada deste gel. M: marcador de peso molecular- ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*)-----114
- ◆ Figura 13: Sequência completa do fragmento 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*. Estão indicados os sítios de restrição presentes no “polylinker” do vetor, próximos ao sítio de clonagem (*Bam HI*). Também estão indicados os sítios de restrição presentes no inserto. A sequência do tRNA<sup>Ser</sup> está em azul, do pseudo tRNA em rosa, do *nad3* em vermelho, e do *rps12* em verde.-----118
- ◆ Figura 14: Mapa de restrição do fragmento 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*. Os genes estão representados por retângulos pretos, e a inserção de 48 pb do pseudo tRNA, por um retângulo hachurado. As regiões abertas pelos subclones também estão indicadas. A região homóloga a *orf167* é a que corresponde ao subclone 1. A direção de transcrição está indicada por setas. Os sítios de restrição indicados são: *Ava I* (A), *Bgl II* (B), *Eco RI* (E), *Pst I* (Ps), *Pvu II* (Pv), *Sst I* (S), *Spe I* (Sp), *Xho I* (X) Os sítios *Pst I* e *Sst I* estão presentes no “polylinker” do plasmídeo pBluescript.-----119
- ◆ Figura 15: Alinhamento entre as sequências dos genes *nad3* e *rps12* do DNAm de coix, milho, trigo, petunia e tabaco. A identidade de bases entre as quatro sequências é indicada por um asterisco.-----121
- ◆ Figura 16 A: Alinhamento entre a sequência da *orf167* amplificada a partir do DNA

- total de *M. polymorpha*, e as sequências do pseudo-tRNA (azul) e *nad3* (vermelho). B: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos do gene *nad3* de coix e a sequência do polipeptídeo deduzido a partir da *orf167*. Os asteriscos correspondem a homologia de bases (A) e aminoácidos (B) entre as duas sequências.-----123
- ◆ Figura 17: Resultado obtido após hibridização da *orf167* (A), do gene *nad3* de trigo (B) e do pseudo-tRNA (C) com a membrana 2Mp. As setas indicam bandas idênticas reconhecidas pelas duas sondas. M: marcador de peso molecular ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*).-----125
  - ◆ Figura 18: Eletroforese em gel de agarose do RNAm total de coix extraído sem ATA (A), com ATA, antes do tratamento com DNase (B), e com ATA, após o tratamento com DNase (C). M: marcador de peso molecular ( $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*)-----127
  - ◆ Figura 19: Hibridização do gene da proteína ATP- $\alpha$ , usado como controle, com a membrana que contém o RNAm total de batata, coix, couve-flor e milho. M: marcador de peso molecular “0.24 - 9.5 kb RNA Ladder”-----128
  - ◆ Figura 20: Hibridização dos subclones 1 (gene *nad3* e pseudo tRNA), 2 (gene *rps12*), 3 (gene *rps12*) e 5 (gene que codifica o tRNA<sup>Ser</sup>) com o RNAm total de coix. M: marcador de peso molecular “0.24 - 9.5 kb RNA Ladder”-----130
  - ◆ Figura 21: Hibridização do RNAm total de coix, milho, batata e couve-flor com o subclone 1 (gene *nad3*), subclone 3 (gene *rps12*) e subclone 5 (gene para tRNA<sup>Ser</sup>). M: marcador de peso molecular “0.24 - 9.5 kb RNA Ladder”-----131
  - ◆ Figura 22 A: Sequência de nucleotídeos do fragmento 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* do DNAm de coix. A sequência dos oligonucleotídeos, utilizados para a confecção e amplificação do cDNA, está sublinhada. B: Sequência de nucleotídeos do gene *rps12* de milho obtida

do banco de dados (o número de acesso é X14709). Utilizou-se a porção final deste gene para se definir a sequência dos oligos frps12 e drps12.-----133

◆ Figura 23: Esquema de um clone formado pela ligação do plasmídeo pGEM-T com os genes *nad3-rps12* amplificados a partir do DNAmT de coix. O sequenciamento deste clone com o oligonucleotídeo Sp6 revelou a porção final do gene *rps12*.-----136

◆ Figura 24: cDNA amplificado por PCR e migrado em gel de agarose. A) cDNA 1 (dnad3/drps12, lote 1); B) cDNA 2 (dnad3/drps12, lote 2); C) cDNA 3 (fnad3/drps12, lote 1); D) cDNA 4 (fnad3/drps12, lote 2). M: marcador ( $\lambda$ Hind III /  $\phi$ X Hae III).--138

◆ Figura 25: Sequência de nucleotídeos do loco *trnS/pseudo-tRNA/nad3/rps12* presente no DNAmT de coix. A sequência de amoniácidos é dada acima da sequência genômica. Os codons alterados pela edição do mRNA, e as correspondentes alterações dos aminoácidos codificados, estão dentro de retângulos numerados. Os nucleotídeos alterados são apresentados por letras minúsculas. As posições dos oligonucleotídeos usados para a síntese dos cDNAs e/ou ampliações por PCR estão indicados por setas.

-----139

◆ Figura 26: Representação do loco mitocondrial *nad3-rps12* e da localização dos sítios de edição encontrados nos 23 clones de cDNA sequenciados. Os sítios de edição estão indicados nos genes *nad3* e *rps12*. Na posição correspondente a cada sítio de edição, um ponto indica que houve edição no clone de cDNA sequenciado. Um círculo vazio indica que não se conhece a situação de edição do sítio no cDNA. Ao lado do esquema dos clones está indicado quantos sítios foram editados de C para U no gene *nad3*, primeiro e no gene *rps12*, depois.-----142

- ◆ Figura 27: Sequência de um dos clones do cDNA sintetizado com o iniciador map5', adicionado de cauda poli-A e amplificado por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos 1 e 2 com cauda poli-T (vide Tabela 1)-----144
- ◆ Figura 28: Alinhamento das sequências de bases do pseudo-tRNA mitocondrial de coix e milho, com a sequência do tRNA<sup>Phe</sup> de batata. Os asteriscos indicam identidade de nucleotídeo nas três sequências.-----153
- ◆ Figura 29: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas NAD3 (A) e RPS12 (B), as quais são afetadas por edições silenciosas (indicados por setas brancas) e não-silenciosas (indicadas por setas pretas), de diversas espécies de monocotiledôneas (MONOC), dicotiledôneas (DICOT), uma espécie de Gimnosperma e *Marchantia polymorpha*. Os asteriscos indicam identidade de aminoácidos em todas as sequências alinhadas. A sequência de aminoácidos dos genes NAD3 e RPS12 de arroz disposta dentro de um retângulo não teve a edição estudada (Suzuki et al., 1991). A sequência de aminoácidos da proteína RPS12 de *Oenothera* corresponde à versão completa do gene *rps12* que está no núcleo. Os sítios de edição estão pré-editados na sequência genômica (Grohmann et al., 1992).-----155

## TABELAS

- ◆ **Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento calculada e empregada nas ampliações. A) oligonucleotídeos utilizados para ampliações das *orfs* mitocondriais da briófito *M. polymorpha*; B e C) oligonucleotídeos utilizados para síntese e amplificação dos cDNAs; D) oligonucleotídeos utilizados para amplificação de fragmentos clonados em plasmídeos.-----**44**
- ◆ **Tabela 2.** Quantidade de material vegetal empregado para a realização das extrações, e o total, em µg, de DNAm<sub>t</sub> ou DNA de cloroplasto (DNAct) obtido.-----**89**

## ABREVIACES

$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ g	Micrograma
BET	Brometo de Etídio
BSA	Bovine Serum Albumine
cDNA	DNA complementar
DNA	cido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DO	Densidade tica
EDTA	cido etileno diaminotetractico
h	Hora
kDa	KiloDaltons
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molaridade
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
p/v	Peso/volume
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	NaCl/Citrato Trissódico

STE	Tris/EDTA/NaCl
TAE	Tris/EDTA/Ácido acético
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Luz ultravioleta
°C	Graus Celsius
DTT	Ditiotreitol
HCl	Ácido Clorídrico
kb	Kilobases
NaCl	Cloreto de Sódio
V	Volts
PEG	Polietileno Glicol
NaOH	Hidróxido de Sódio
ATA	Ácido auriltricarboxílico
MOPS	[3 - (N-Morfolino) Ácido Propanosulfônico]
v/v	Relação volume/volume

---

**RESUMO**

Com o objetivo de identificar e clonar um gene novo do DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) de *Coix lacryma-jobi* L. (coix), utilizou-se a estratégia da hibridização heteróloga. Para tanto amplificou-se por PCR um fragmento correspondente a um quadro de leitura aberto (“open reading frame”-orf), denominado *orf167*, presente no DNAm<sub>t</sub> da briófito *Marchantia polymorpha*, e tido como um possível gene. Marcou-se radioativamente e utilizou-se esta sequência como sonda em hibridizações com o DNAm<sub>t</sub> de coix digerido com várias enzimas. Identificou-se um fragmento homólogo *Bgl II / Bgl II* de 1,4 kb, o qual foi clonado em pBluescript. Elaborou-se o mapa de restrição deste fragmento e localizou-se nele a exata região de homologia com a *orf167*. A região de homologia estava presente em um fragmento interno de 0,5 kb *Spe I / Pvu II*. Este fragmento de 0,5 kb, homólogo à *orf167*, foi utilizado em hibridizações com o DNAm<sub>t</sub> de várias espécies de plantas superiores (alfafa, batata, coix, couve-flor, ervilha, milho e soja), verificando-se que o mesmo correspondia a uma sequência altamente conservada. Este mesmo fragmento foi também hibridizado em membranas contendo o RNAm<sub>t</sub> total de coix e de outras espécies de plantas superiores (milho e couve flor). Os resultados revelaram que ele é transcrito na mitocôndria das espécies analisadas. O fragmento original de 1,4 kb *Bgl II / Bgl II* foi dividido em 5 subfragmentos, os quais foram clonados e sequenciados. Após a análise da homologia desta sequência com outras presentes nos bancos de dados, verificou-se que o fragmento de 1,4 kb *Bgl II / Bgl II*, isolado do DNAm<sub>t</sub> de coix, contém um “cluster” gênico onde estão presentes o gene que codifica o tRNA serina (tRNA<sup>Ser</sup>), um pseudo-gene provavelmente originado do tRNA fenilalanina (tRNA<sup>Phe</sup>), os genes *nad3* e *rps12*. Tais genes presentes em coix são muito similares àqueles presentes em trigo e

milho, os quais se organizam também em um "cluster" gênico muito similar ao existente em coix.

Estudos de expressão realizados através de "Northern Blotting" e RT-PCR mostraram que os genes  $tRNA^{Ser}$ , *nad3* e *rps12* são transcritos, sendo os dois últimos cotranscritos. Vinte e três clones de cDNA dos transcritos dos genes *nad3* e *rps12* foram sequenciados, e tiveram suas sequências comparadas com a sequência genômica. Encontrou-se 21 sítios de edição nos transcritos do gene *nad3* e 8 sítios nos transcritos do gene *rps12*. Após comparações entre a sequência de aminoácidos predita a partir do clone genômico e do cDNA, observou-se que todas as edições modificam o aminoácido especificado pelo codon onde o evento de edição foi detectado, tornando a sequência de aminoácidos editada diferente da prevista pela sequência genômica. Vinte sítios de edição no gene *nad3*, e 6 no gene *rps12*, alteram a identidade do codon, de modo a especificar um aminoácido mais conservado durante a evolução entre diferentes espécies vegetais. Os outros três sítios, sendo 1 no gene *nad3* e 2 no gene *rps12*, acarretam mudanças raras, espécie-específicas e não conservativas. Todos os 23 clones de cDNA investigados estavam diferentemente editados, predominando os cDNAs com sítios parcialmente editados. Não foi encontrada nenhuma orientação preferencial (5' para 3', ou 3' para 5') para o processamento da edição. Discute-se os motivos do reconhecimento do gene *nad3* de coix pela *orf167* de *M. polymorpha*.

---

**ABSTRACT**

We have cloned and sequenced the *nad3* and *rps12* mitochondrial genes from *Coix lacryma-jobi* L., whose sequence were found to be similar to the corresponding genes in wheat and maize. In addition, we have indentified a tRNA<sup>Ser</sup> and a pseudo-tRNA genes on the 5' upstream of *nad3*, generating a locus organization which is identical to what has been observed in wheat and maize. The locus identification was performed with a heterologous hibridization using the mitochondrial probe *orf167* from *Marchantia polymorpha*. The gene expression was analysed using Northern hybridization and RT-PCR, indicating that *nad3* and *rps12* gene were cotranscribed in a 1.3 kb RNA molecule. Concernig the RNA editing, we have found 21 and 8 sites in the *nad3* and *rps12* genes respectively. In general terms, the observed coix mRNA editing has changed the codon identities in such a way that the NAD3- and RPS12- protein aminoacid sequence was kept closer to the corresponding ones in other organisms. However, we have detected three specie-specific editing sites which were not conservative. As for the editing processing, we have analysed 23 cDNA clones which showed different editing patterns. A predominance of partial editing was observed where the edited sites were randomly distributed.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta de que as mitocôndrias possuem informação genética própria sob a forma de DNA (Nass e Nass, 1963), um grande número de estudos foram realizados para compreender sua organização, estrutura e expressão.

O genoma mitocondrial parece ser remanescente de um antigo evento endossimbiótico, a partir do qual o seu ancestral foi adquirindo especialização na conversão de energia química, particularmente a respiração (Gray, 1989a; Gray, 1989b). As mitocôndrias de plantas, animais e fungos possuem funções comuns, refletindo similaridades entre seus genomas ao nível funcional. Assim, um grupo comum e básico de genes está presente em todos os genomas mitocondriais: geralmente eles possuem genes que codificam RNAs ribossômicos, RNAs transportadores mitocondriais, algumas proteínas ribossômicas, bem como alguns polipeptídeos que fazem parte da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, localizados na membrana mitocondrial interna (Binder et al., 1996).

Embora as funções genéticas do DNA mitocondrial (DNAmt) sejam bem conservadas, o tamanho, a estrutura e a organização dos genes são radicalmente diferentes entre, e muitas vezes dentro, dos quatro reinos eucarióticos: Animais, Vegetais, Fungos e Protistas.

O genoma mitocondrial das plantas superiores é muito maior e mais complexo que o de outros eucariotos (Newton, 1988). A estrutura “in vivo” deste genoma tem sido alvo de muitas discussões mas edificou-se, no decorrer da década de 80 e início de 90, um sólido consenso de que a estrutura do genoma mitocondrial de plantas superiores é formada por

uma população de moléculas subgenômicas circulares, as quais tem origem a partir de um cromossomo principal (“master”) circular. (revisto por Lonsdale, 1984; Newton, 1988; Gray, 1989a; 1989b; Breiman e Galun, 1990; Hanson e Folkerts, 1992 ).

O grande tamanho do genoma mitocondrial de plantas superiores, em relação ao DNAmT em animais e fungos, pode ser explicado em função de três fenômenos específicos: a mitocôndria de plantas codifica duas a três vezes mais genes, muitos dos quais ainda são desconhecidos; as frequentes recombinações e rearranjos de sequências levaram a formação de pseudogenes, os quais se mantêm no genoma; a integração de sequências de outros compartimentos celulares, tais como sequências do DNA do núcleo e do cloroplasto (DNAct) (Schuster e Brennicke, 1988).

Mais de 300 polipeptídeos estão envolvidos no funcionamento mitocondrial. Estima-se que somente 10 a 15% deles sejam codificados pelo genoma mitocondrial, sendo os outros codificados pelo núcleo, sintetizados no citoplasma e importados para a mitocôndria (Attardi e Schatz, 1988).

Os polipeptídeos codificados por genes mitocondriais são sintetizados dentro da mitocôndria, pois ela possui seu próprio sistema de síntese protéica. O DNAmT de Angiospermas e da briófito *Marchantia polymorpha* contém genes que codificam três rRNA (26S, 5S e 18S), vários tRNAs e várias proteínas ribossômicas.

O DNAmT da *M. polymorpha* foi analisado por microscopia eletrônica, mapeado com base nos sítios de cortes de endonucleases de restrição e completamente sequenciado (Oda et al., 1992). Tais estudos mostraram características as quais sugerem que o genoma mitocondrial da briófito se assemelha à forma primitiva do genoma mitocondrial de plantas, a qual teria se originado a partir de um endossimbionte (Gray, 1989a; 1989b; Oda et al., 1992).

O conhecimento da informação genética do genoma mitocondrial das plantas avançou muito com a determinação da sequência genômica completa do DNAm de *M. polymorpha* (revisado por Schuster e Brennicke, 1994). Verificou-se que este genoma apresenta praticamente todos os genes já descritos nas mitocôndrias de plantas superiores. Quando da publicação da sequência de nucleotídeos do genoma mitocondrial desta briófitas, 28 *orfs* identificadas tinham função desconhecida, devido a ausência de homologia com qualquer sequência gênica presente nos bancos de dados.

Essas *orfs* mitocondriais são quadros de leitura aberta, que apresentam um codon de iniciação e um codon de terminação. Algumas destas *orfs* já foram confirmadas como genes, pois tiveram suas funções elucidadas. Este fato faz com que outras *orfs* sejam fortes candidatas a genes funcionais. As *orfs* que tiveram sua função elucidada encontram-se justapostas no DNAm da briófitas e codificam 4 proteínas homólogas a polipeptídeos envolvidos na biogênese do citocromo c, os quais foram descritas em *Rhodobacter capsulatus*.

Com o intuito de se identificar novos genes mitocondriais em plantas superiores analisamos seis *orfs* da briófitas *M. polymorpha*. Analisamos a conservação destas *orfs* no DNAm de sete espécies de plantas superiores (alfafa, batata, coix, couve flor, milho, soja e ervilha). Dados sobre a conservação destas *orfs* poderiam gerar mais evidências sobre o fato delas serem novos genes. As *orfs* analisadas foram: *orf86a*, *orf99*, *orf109*, *orf136*, *orf167* e *orf207*. Dentre estas, a *orf167* foi a que apresentou o resultado mais promissor, pois verificou-se que o DNAm de batata, coix, ervilha, milho e soja apresentavam sequências homólogas a ela. Este resultado levou-nos a estudar em detalhes um fragmento, presente no DNAm de coix, homólogo a *orf167*. Realizou-se a clonagem deste fragmento e estudou-se a estrutura e transcrição do mesmo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Organização do DNAm de plantas superiores

O genoma mitocondrial de plantas superiores é maior e mais complexo que o de outros eucariotos (Newton 1988). Dentre as espécies já estudadas, o tamanho varia de 200 kb, em *Brassica oleraceae*, a mais de 2400 kb, em *Cucumis melo* (Ward et al., 1981), sendo que em fungos e protistas ele varia de 6 a 180 kb, e em animais, de 14 a 40 kb (revisado por Gray 1989a).

Muito já se discutiu sobre a estrutura “in vivo” deste genoma e um sólido consenso formou-se em torno da aceitação de que a estrutura do genoma mitocondrial das plantas superiores é constituída por um conjunto de moléculas subgenômicas circulares que tem origem a partir de um cromossomo principal circular. Este cromossomo representa o genoma completo e, através de recombinações intra e intermoleculares via sequências repetidas diretas e invertidas, ele gera moléculas subgenômicas ou formas isômeras do círculo principal (revisado por Lonsdale, 1984; Newton, 1988; Gray, 1989a; 1989b; Breiman e Galun, 1990; Hanson e Folkerts, 1992 ).

Com base neste modelo, foram construídos mapas físicos do DNAm de várias espécies de plantas, baseados nos sítios de corte de endonucleases de restrição. Assim, são conhecidos, entre outros, os mapas do DNAm de milho (*Zea mays*) citoplasma fértil (Lonsdale et al., 1984), de *Brassica campestris* (nabo redondo – “turnip”), o qual revelou uma estrutura “tripartite” em função de um par de sequências repetidas diretas de 2 kb (Palmer e Shields, 1984) e de *Beta vulgaris* (beterraba) (Brears e Lonsdale, 1988). O mapa físico do DNAm de *Brassica hirta* (mostarda branca) (Palmer e Herbon, 1987) e *M.*

*polymorpha* (Oda et al., 1992), entretanto, revelou uma estrutura centrada em um cromossomo circular único, o qual não sofre recombinações, devido à ausência de sequências repetidas recombináveis.

Desta forma, com base nos dados de mapas físicos, e na estrutura circular comprovada por microscopia eletrônica das pequenas moléculas de DNAm<sub>t</sub> das células animais, assumiu-se que a estrutura do DNAm<sub>t</sub> de plantas e fungos é circular.

Porém, Bendich (1993) e Schuster e Brennicke (1994) contestaram este consenso, devido à dificuldade de se visualizar, através de microscopia eletrônica, moléculas circulares genômicas ou subgenômicas do DNAm<sub>t</sub> de plantas superiores. Estes pesquisadores consideram que a principal forma "in vivo" do DNAm<sub>t</sub> de plantas e fungos são moléculas de DNA lineares, devido a abundância de formas lineares (muitas vezes maiores que o tamanho predito para o genoma mitocondrial) encontrada nestes estudos. Eles também questionam se o mapa de restrição é realmente um critério adequado para inferir a circularidade de uma molécula de DNA. Através da migração do DNAm<sub>t</sub> de plantas e fungos em gel de agarose, utilizando-se eletroforese em campo pulsado ("Pulse-field"), Bendich (1993) detectou extensas moléculas de DNA lineares e um rastro de DNA ("smear") representando uma população heterogênea de moléculas lineares. Ele interpretou estes resultados como sendo devido a existência de moléculas lineares como a principal forma "in vivo" do DNAm<sub>t</sub> de plantas e fungos.

Sob o ponto de vista exposto anteriormente, os círculos, que representariam somente uma pequena fração do DNAm<sub>t</sub> em muitos eucariotos, são formas opcionais da estrutura do genoma mitocondrial, sem importância para a função mitocondrial. Estes círculos são, segundo estes autores, produtos de eventos de "recombinação acidental" entre sequências repetidas diretas, dentro de ou entre moléculas lineares. A recombinação seria

necessária para alguns processos importantes, como replicação (semelhante ao modelo de replicação “rolling-circle” encontrado em fagos) e reparo, e, ocasionalmente, geraria produtos circulares subgenômicos.

A mitocôndria de várias espécies de plantas contém, além do DNAm<sub>t</sub> principal, pequenas e abundantes moléculas de ácido nucléico autoreplicativas. Estas moléculas, representadas por fitas de DNA lineares e circulares, assim como RNA simples e dupla-fita, são independentes do DNAm<sub>t</sub> principal, podendo ou não apresentar homologia com sequências do cromossomo principal (Lonsdale, 1984). Muitas dessas moléculas minicirculares e minilineares foram sequenciadas. Demonstrou-se que várias delas possuem *orfs* de funções desconhecidas. Verificou-se a relevância de somente um plasmídeo de 2,3 kb presente em milho, visto que ele possui a única cópia funcional do gene que codifica o tRNA<sup>T<sub>TP</sub></sup> (revisito por Newton, 1988).

A análise da sequência genômica mitocondrial completa da briófitas *M. polymorpha* (Oda et al., 1992) foi um dos principais avanços no conhecimento do conteúdo de informação presente no genoma mitocondrial de plantas. Há mais genes no DNAm<sub>t</sub> de plantas que no DNAm<sub>t</sub> dos mamíferos. Encontrou-se 94 “open reading frames” no DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha*, um número que é sete vezes maior que o número encontrado no DNAm<sub>t</sub> de animais (13 “open reading frames”- revisito por Schuster e Brennicke, 1994).

A diferença de tamanho observada entre o DNAm<sub>t</sub> de mamíferos e o DNAm<sub>t</sub> da briófitas é, em grande parte, o resultado da presença de introns e de sequências duplicadas na briófitas (Oda et al., 1992; Ohta et al., 1993). Nas briófitas, nenhuma destas sequências duplicadas possuem capacidade recombinatória. Porém, nas plantas superiores, algumas destas sequências podem ter vários kilobases de tamanho e participar de recombinações homólogas, o que resulta em um arranjo complexo de moléculas (Wissinger et al., 1991).

As recombinações e ampliações de sequências respondem pela diferença de tamanho verificada entre o genoma mitocondrial da briófitas e o genoma mitocondrial das plantas superiores, os quais diferem em fatores que variam de 1 a 15. A integração de sequências oriundas do cloroplasto e do núcleo também contribuem para a expansão do genoma mitocondrial das plantas superiores. O número de genes do DNAmT da briófitas e das plantas superiores é similar. Somente o gene *nad7* e as várias *orfs* relacionadas com CMS (“Cytoplasmic Male Sterility”), presentes no DNAmT das plantas superiores, não foram encontrados no DNAmT da hepática (revisado por Schuster e Brennicke, 1994).

Nas diferentes espécies estudadas, observou-se que as sequências integradas, originárias do genoma nuclear ou do cloroplasto, bem como o seu local de inserção no genoma mitocondrial são aleatórios (Stern e Palmer, 1984; Wintz et al., 1988). Sequências que codificam tRNAs ou outros genes, originários do genoma do cloroplasto, uma vez integradas no DNAmT, podem ou não conservar a capacidade de se expressar (Breiman e Galun, 1990). Foram identificadas algumas sequências de origem nuclear integradas no DNAmT de *Oenothera lamarckiana* (Hanson e Folkerts, 1992; Schuster e Brennicke, 1988; 1994). O fluxo de material genético da mitocôndria para o núcleo também ocorre em plantas: o plasmídeo S1, presente na mitocôndria de milho, e alguns genes da cadeia de transporte de elétrons, de origem mitocondrial, foram encontrados no núcleo. Não se conhece o mecanismo de transferência nem a natureza da molécula integrada (DNA ou RNA) durante o processo de transferência. Muitas hipóteses já foram formuladas, sugerindo-se que moléculas de RNA estejam envolvidas na transferência e/ou integração das sequências (Schuster e Brennicke, 1988).

## 2.2. Genes mitocondriais

### 2.2.1. Genes presentes no DNAm das plantas superiores

Mais de 300 polipeptídeos estão envolvidos no funcionamento mitocondrial. Estima-se que somente 10 a 15% deles sejam codificados pelo genoma mitocondrial. Os outros genes são codificados pelo núcleo, sintetizados no citoplasma e importados para a mitocôndria (Attardi e Schatz, 1988). Na membrana mitocondrial externa de batata, foram identificados cinco prováveis receptores de superfície, envolvidos na importação de proteínas (Heins e Schmitz, 1996).

Quase todos os genes que codificam subunidades dos complexos protéicos da cadeia respiratória, presentes no genoma mitocondrial de animais, com exceção do gene *atp8*, já foram identificados no genoma mitocondrial de *M. polymorpha* e *Arabidopsis thaliana*, cujos genomas mitocondriais foram recentemente sequenciados (Oda et al., 1992; Unseld et al., 1997), sendo eles:

- 9 subunidades do complexo I (NADH-ubiquinona-oxidoreductase): *nad1-7*, *nad9* e *nad4l* (Stern et al., 1986; Xue et al., 1990; Gualberto et al., 1988; Wintz et al., 1989; Pereira de Souza et al., 1991; Haouazine et al., 1992; Gäbler et al., 1994).

-1 subunidade do complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase): *cob* (Dawson et al., 1984).

-3 subunidades do complexo IV (citocromo c oxidase): *cox1*, *cox2* e *cox3* (Issac et al., 1985b; Fox e Leaver, 1981; Hiesel et al., 1987).

-3 subunidades do complexo ATP sintetase: *atpα*, *atpβ* e *atp9* (Issac et al., 1985a; Dewey et al., 1985a; 1985b).

Os polipeptídeos codificados por genes mitocondriais são sintetizados dentro da mitocôndria, pois ela possui seu próprio sistema de síntese protéica (**Figura 1**). O DNAmT das Angiospermas e da *M. polymorpha* contém genes que codificam três rRNA (26S, 5S e 18S), vários tRNAs e várias proteínas ribossômicas.

O genoma dos plastídeos contém genes que codificam todos os tRNA necessários a síntese protéica. Entretanto, ainda não encontrou-se um grupo completo de tRNAs nos genomas mitocondriais de plantas superiores estudados até o presente (Ceci et al., 1996).

Há claramente uma tendência evolutiva em direção a uma substituição funcional, e subsequente perda dos genes mitocondriais que codificam tRNAs em plantas superiores. A briófito *M. polymorpha* contém 29 genes que codificam tRNAs, enquanto que o girassol possui apenas 11 (sendo que 10 se expressam) e o milho somente 10. Por exemplo, o gene que codifica o tRNA<sup>His</sup> foi clonado a partir do DNAmT de uma Gimnosperma, mas está ausente do DNAmT das Angiospermas; os genes para tRNA<sup>Phe</sup> e tRNA<sup>Cys</sup> não existem em muitas espécies, tendo sido substituídos por genes presentes em fragmentos de origem cloroplastidial que foram inseridos no genoma mitocondrial, ou por tRNAs importados do citossol (revisto por Marechal-Drouard et al., 1996). Em arroz, nove genes que codificam tRNAs foram localizados em sequências oriundas do genoma do cloroplasto. Sete destas sequências são transcritas e corretamente processadas sendo, portanto, funcionais (Miyata et al., 1998).

Um quinto dos tRNAs usados no sistema de tradução das mitocôndrias de plantas são codificados por genes derivados do cloroplasto. Com o intuito de entender-se como as

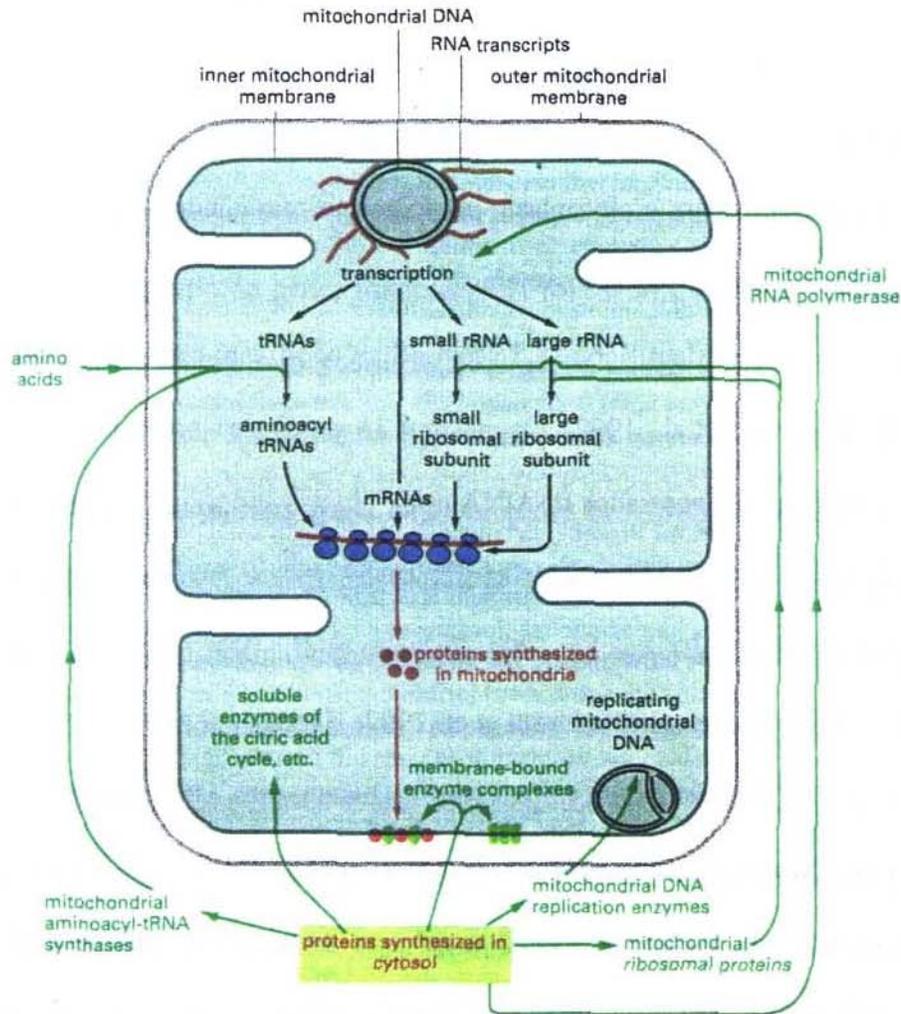


Figura 1: Esquema representando o maquinário de síntese protéica mitocondrial. Verifica-se que, mesmo possuindo seu próprio maquinário de síntese, a mitocôndria ainda necessita de proteínas e tRNAs importados do citosol para o seu funcionamento (Alberts et al., 1994).

aminoacil-tRNA sintetases se adaptaram à presença destes tRNAs de origem cloroplastidial nas mitocôndrias. Menand et al. (1998) estudaram os cDNA dos transcritos nucleares da metionil-tRNA sintetase, em *Arabidopsis thaliana*. O gene que codifica a enzima está no núcleo, mas é originário do cloroplasto, e os estudos indicaram que a proteína codificada por ele é transportada tanto para o cloroplasto como para a mitocôndria, sendo processada para a sua forma madura em ambas as organelas.

Em *M. polymorpha* identificou-se 16 genes que codificam proteínas ribossômicas (Oda et al., 1992; Takemura et al., 1992). Os mesmos 16 genes para proteínas ribossômicas descritos na briófitas foram encontrados no DNAmT de plantas superiores, sendo eles: *rps1*, *rps2*, *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps8*, *rps10*, *rps11*, *rps12*, *rps13*, *rps14*, *rps19*, *rpl2*, *rpl5*, *rpl6* e *rpl16* (revisado por Schuster e Brennicke, 1994; Zalungo et al., 1994; Zalungo et al., 1995; Knoop et al., 1995; Lippok et al., 1996; Unsel et al., 1997; Handa et al., 1998).

O gene *rps10* foi identificado no DNAmT de batata, mas está ausente do DNAmT de trigo e ervilha. Nestas espécies, ele se encontra no DNAmT como uma cópia não funcional, tendo sido, provavelmente, translocado para o núcleo (Zalungo et al., 1994; Zalungo et al., 1995). Knoop et al., (1995), ao contrário do apresentado por Zalungo et al., (1994 e 1995), verificaram que o gene *rps10* está presente como cópia funcional no DNAmT de ervilha, mas está ausente do DNAmT de *Arabidopsis thaliana* e *Oenothera berteriana*. O gene *rps4* foi identificado na região 5' dos exons *a* e *b* do gene mitocondrial *nad2*, em *A. thaliana* (Lippok et al., 1996). O gene *rps4* foi recentemente descrito no DNAmT de mostarda e de arroz, tendo sido também detectado no DNAmT de trigo, milho, soja e rabanete através de hibridizações (Handa et al., 1998). O sequenciamento do genoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (Unsel et al., 1997) revelou os genes *rps2*, *rps8*, *rps11* e *rpl16*.

Yang e Mulligan (1996) identificaram uma molécula de RNA mitocondrial do tipo 4,5S na mitocôndria de milho, a qual possui um segmento idêntico a uma sequência de 15 nucleotídeos presente em uma região altamente conservada no RNA 4,5S de *Escherichia coli*. Este RNA se complexa como uma ribonucleoproteína e parece ter função no processo de tradução e/ou direcionamento de proteínas para a membrana mitocondrial interna.

Um novo grupo de genes mitocondriais foi identificado em vegetais com base na similaridade de sequência com genes bacterianos, os quais são essenciais à biogênese do citocromo c. Na bactéria *Rhodobacter capsulatos*, estes genes se organizam em dois locos: o loco *ccl*, o qual contém dois genes cujos produtos provavelmente atuam como proteínas do tipo chaperoninas, com orientação para o periplasma; e o loco *hel*, o qual contém cinco genes, *helA-D*, que codificam o transportador do grupo heme tipo ABC, e *helX* que codifica uma enzima, dissulfido oxidoreductase, necessária à mediação de diferentes reações de óxido-redução (revisto por Handa et al., 1996 e Schuster, 1994).

Nesta bactéria fotossintética existem duas vias funcionais necessárias à biogênese dos citocromos tipo-c: a primeira via está envolvida na liberação do grupo heme (Ccl2, HelX e CycJ), enquanto a outra está envolvida na apresentação do apocitocromo e na tio-redução (Ccl2, HelX, e CycH) (revisto por Kranz et al., 1998).

O gene *helC* de *R. capsulatos*, cuja proteína parece ser necessária a exportação de oxigênio para o periplasma, possui homologia com a *orf240*, descrita em trigo. Este gene também é homólogo à *orf228*, presente no DNAmT de *M. polymorpha* (Bonnard e Grienenberger, 1995), a qual, até então, não tinha a sua função conhecida. No DNAmT de arroz e de *Oenothera berteriana* também foram encontrados *orfs* com homologia ao gene *helC*, sendo elas, respectivamente, a *orf240* (Nakazono et al., 1996a) e a *orf250* (Jekabsons e Schuster, 1995).

O gene *helB* de *R. capsulatos* é homólogo à *orf206*, presente no DNAmT de *O. berteriana*, e à *orf277*, presente no genoma mitocondrial de *M. polymorpha* (Schuster, 1994). Este gene (*helB*) é igualmente homólogo à *orf206* presente no DNAmT de tomate (Shikanai et al., 1996), ao gene *ccb206* descrito no genoma mitocondrial de *A thaliana* (Unsold et al., 1996), à *orf206* encontrada no DNAmT de trigo (revisto por Itani e Handa, 1998) e ao gene *ccb206* encontrado no genoma mitocondrial de *Brassica napus* L. (mostarda) (Itani e Handa, 1998)

O gene *ccl1*, presente em *R. capsulatos*, é homólogo à *orf589*, presente no DNAmT de trigo, e à *orf509* de *M. polymorpha* (Gonzalez et al., 1993). Em *O. berteriana*, análises das regiões transcritas do genoma revelaram uma *orf* de 577 codons (*orf577*), que é também conservada em cenoura (*orf579*), e apresenta homologia à região N-terminal da proteína Ccl1 (Schuster et al., 1993). Em *O. berteriana* identificou-se a *orf454*, homóloga à região C-terminal da proteína Ccl1 de *R.capsulatos*. A *orf454* é também similar a duas *orfs* que se sobrepõe, presentes no DNAmT de *M. polymorpha*: *orf169* e *orf322*. No genoma mitocondrial de mostarda (*Brassica napus* L.) foi indentificada a *orf577*, também homóloga ao gene bacteriano *ccl1* (Handa et al., 1996).

Na briófita *M. polymorpha*, as *orfs* 228, 277, 509, 169 e 322, homólogas ao genes *helC* (*orf228*), *helB* (*orf277*) e *ccl1* (*orf509* e as *orf169* e *orf322*, que são sobrepostas) de *R. capsulatos*, estão agrupadas em um "cluster", assim como estão seus genes homólogos presentes na bactéria.

Pelo menos 10 *orfs* foram descritas em várias espécies de plantas superiores, sendo elas conservadas entre diferentes espécies de plantas. Entretanto, suas funções não foram ainda elucidadas (revisto por Schuster e Brennicke, 1994). Entre elas, está a *orf221*, inicialmente designada como *orf25* e primeiro descrita em milho CMS-T. A presença de

sequências homólogas a *orf221*, no genoma mitocondrial de todas espécies de plantas examinadas, a verificação de que ela é transcrita e a descoberta de que os transcritos são editados sugeriam que a *orf221* codificava um polipeptídeo na mitocôndria de plantas. Em 1993, Prioli et al., demonstraram a existência de uma proteína de membrana codificada pela *orf221*.

### 2.2.2. Introns mitocondriais

Alguns genes mitocondriais de plantas superiores possuem introns. Os introns organelares são classificados como do Grupo I ou do Grupo II, segundo sua estrutura secundária e seu modo de excisão (Michel et al., 1989). Até 1994, nenhum intron do grupo I havia sido encontrado em genes mitocondriais de Angiospermas, de forma que se acreditava que eles poderiam estar completamente ausentes destes genomas (Schuster e Brennicke, 1994). Porém a análise do gene *coxI* de *Peperomia polybotrya* revelou a presença de um intron do grupo I, o qual, baseado na homologia com o intron aI4 do gene *coxI* de levedura, provavelmente codifica uma endonuclease sítio específica. Esta endonuclease permitiria que o intron funcionasse como uma ribozima durante sua auto-excisão. Acredita-se que este intron tenha surgido por transferência horizontal a partir de um fungo doador (Vaughn et al., 1995).

O processamento dos transcritos primários de genes, que possuem introns do grupo II, envolve eventos em "cis" e/ou em "trans" para a excisão dos introns (Schuster e Brennicke, 1994).

### 2.2.3. Edição

RNAs mitocondriais de plantas superiores sofrem modificações pós-transcricionais pré-determinadas, conhecidas como edição. O evento de edição geralmente envolve trocas de C para U, e ocasionalmente de U para C, na molécula precursora do mRNA.

Até o presente, a maioria absoluta dos transcritos dos genes que codificam proteínas na mitocôndria de plantas superiores sofrem edição, com exceção do gene *T-urf3*. Este gene mitocondrial é específico de milho com citoplasma macho estéril do tipo Texas (Ward e Levings, 1991). Os genes *atp6* e *nad3-rps12* do DNAm de rabanete (Krishnasamy et al., 1994; Rankin et al., 1996), também não sofrem edição. O gene *atp6* possui todas as posições normalmente editadas nas outras espécies já pré-editadas na sua sequência genômica, não necessitando, portanto, de sofrer edição no transcrito. Já os genes *nad3-rps12* possuem algumas posições de edição já pré-editadas; as demais, porém, não são editadas na molécula de mRNA, sugerindo fortemente que estes dois genes não são ativos na mitocôndria de rabanete.

Há uma forte tendência para edições no mRNA que alterem os aminoácidos especificados pelos codons (Handa, 1992; Ito et al., 1996) e, muitas vezes, as sequências editadas correspondem àquela conservada evolutivamente entre diferentes organismos. No entanto, os sítios de edição podem também estar fora de regiões codificadoras, aparecendo nas sequências 5' e 3' não traduzidas dos genes (revisado por Walbot, 1991). Já foi verificado que o processo de edição é capaz de criar codons de iniciação (AUG) (Kadowaki et al., 1995) e de terminação da tradução, como nos transcritos do gene *atp6* de milho,

sorgo e *Oenothera berteriana* (Kumar e Levings, 1993), assim como remover codons de terminação (revisto por Hanson e Folkerts, 1992).

A edição pode também ocorrer em rRNA. Sítios de edição foram encontrados no rRNA 26S em *O. berteriana*, e no rRNA 18S em trigo (revisto por Maier et al., 1996).

Até então, poucos sítios de edição foram observados em tRNAs. Estes eventos de edição geralmente ocorrem para corrigir pareamentos errôneos de bases, os quais impediriam a formação da estrutura secundária correta no tRNA e, por conseguinte, seu processamento. Um evento de edição no tRNA<sup>Phe</sup> (GAA) da mitocôndria de ervilha e batata corrige um pareamento errôneo C-A na região acceptora (Marechal-Drouard et al., 1993). Recentes estudos mostraram que a conversão C-para-U na posição 4 do tRNA<sup>Phe</sup> (GAA), em batata, não é necessária para a aminoacilação com fenilalanina, mas é essencial para o processamento correto deste tRNA (Marechal-Drouard et al., 1996). Na mitocôndria de *O. berteriana* o mesmo evento de edição ocorre no tRNA<sup>Phe</sup> (GAA), e, também nesta planta, outra edição corrige um pareamento errado no "stem" do anticodon do tRNA<sup>Cys</sup> (GCA) (revisto por Maier et al., 1996).

Encontrou-se sítios de edição em introns presentes no pré-RNA. Também neste caso, a edição possibilita a formação correta da estrutura secundária do intron, o que é necessário para sua auto-excisão. Por exemplo, o intron *nad1-c/d* do grupo II não pode ser excisado do transcrito primário sem uma edição prévia no seu domínio 6 (Börner et al., 1995).

Begu et al., (1998) estudaram a sequência da *orf mat-r* de batata e o estado de edição dos transcritos em dois sistemas, trigo e batata. Esta *orf* codifica uma proteína similar às transcritases reversas retrovirais. Nestas plantas, a *orf* faz parte de introns que sofrem "trans-splicing", os quais estão em duas diferentes configurações, conforme a

espécie, em relação a posição dos exons “d” e “e” do gene *nad1*. Em geral, nas monocotiledôneas, o intron que contém a *orf* está fisicamente ligado ao exon “e”, e, nas dicotiledôneas já estudadas, verificou-se que ele está ligado ao exon “d” (revisto por Begu et al., 1998). Os estudos revelaram que os transcritos desta *orfs* sofrem edições, muitas das quais se acumulam nos domínios transcriptase reversa e maturase do gene *mat-r*, o que aumenta a similaridade da proteína com as proteínas homólogas presentes em outros organismos, e sugere que a proteína codificada é funcional nestas plantas.

Três possíveis mecanismos bioquímicos foram propostos como sendo responsáveis pelo fenômeno de edição: 1) substituição de todo o nucleotídeo; 2) troca da base nitrogenada por reação de trans-glicolisação 3) alteração da base nitrogenada por ação de deaminase (Araya et al., 1994). Recentes experimentos excluíram as hipóteses de que a edição pudesse ser obtida por um mecanismo de substituição de todo o nucleotídeo, ou por troca da base nitrogenada através de uma reação de trans-glicosilação. Desta forma, atualmente acredita-se que o mecanismo envolve a alteração da base nitrogenada por ação de alguma enzima deaminase (revisto por Mayer et al., 1996).

Tem-se pesquisado as bases da especificidade do processo de edição que permite a escolha das citidinas a serem editadas, mas nenhuma sequência consenso ou estrutura secundária comum foi encontrada. Desta forma, parece altamente improvável que a seleção do sítio de edição seja realizado por fatores protéicos específicos.

Acredita-se que a sequência ao redor dos sítios de edição seja importante para o reconhecimento do sítio a ser editado. Este reconhecimento poderia ser realizado por pequenas moléculas de RNA que atuariam como guias (gRNA), assim como ocorre no processo de edição em Tripanossomatídeos, e seriam codificadas por genes nucleares (Walbot, 1991; Bock e Maliga, 1995; revisto por Mayer et al., 1996).

Kumar e Levings (1993) acreditam que os transcritos do gene quimérico *C-atp6*, presente em milho citoplasma macho estéril, sejam editados de maneira sequência-específica. Uma vez que o transcrito do gene quimérico *C-atp6* apresenta grande similaridade, no número e posição dos sítios de edição, em relação ao transcrito do gene *atp6* de sorgo e *O. berteriana*, supõe-se que sequências ao redor dos sítios de edição sejam importantes para o processo.

Com o intuito de examinar os fatores determinantes para o reconhecimento do sítios de edição, analisou-se sequências repetidas de DNA mitocondrial com nucleotídeos editados, como substratos de edição. Assim, em milho, foram analisados quatro sítios de edição presentes no gene *rps12* e em uma cópia da parte interna deste gene, conhecida como *rps12b* e originada pela recombinação entre os genes *rps12*, o íntron 1 do gene *rps13* e uma região do plasmídeo de 2,3 kb tipo S1 (Willians et al., 1998). Observou-se uma única mutação de base na posição -5, em relação ao primeiro sítio de edição do segmento *rps12b*. Verificou-se que a edição foi eliminada neste sítio de edição da cópia *rps12b*. Os demais sítios continuaram sendo editados no *rps12b*. Estudos de predição de estrutura secundária sugeriram que a mudança no reconhecimento do sítio de edição não se correlaciona com diferenças na estrutura secundária, e que a sequência primária do RNA pode ser a responsável pela especificação do sítio de edição. Estas constatações favorecem a hipótese da existência de moléculas de gRNA como responsáveis pelo reconhecimento da sequência primária a ser editada, e como orientadoras do aparato de edição, por conseguinte.

Análises de cDNA revelaram três categorias de genes com relação a extensão de edição nos seus transcritos: na primeira categoria estão os genes que apresentam todos os seus transcritos completamente editados, tendo-se como exemplo os transcritos do gene *atp9* de diferentes espécies; na segunda categoria encontram-se os genes cujos transcritos são

heterogêneos com relação à extensão de edição, sendo os transcritos parcialmente editados até mesmo mais abundantes que os transcritos completamente editados, como no caso do gene *atp6* em petunia; a última categoria inclui genes cujos transcritos requerem excisão de introns ou outro tipo de processamento para maturação. Nesta categoria, os transcritos correspondendo ao mRNA maduro destes genes apresentam maior número de sítios editados que os seus respectivos transcritos precursores. Pode-se dizer, assim, que o processo de edição acompanha a maturação do transcrito, tendo, ou não, relação direta com este processo. Como exemplo desta terceira categoria tem-se os transcritos do gene *cox2* de petunia e milho (revisto por Lu et al., 1996).

Transcritos totalmente editados e transcritos parcialmente editados do gene *nad9* parecem estar engajados no processo de tradução em batata, uma vez que ambos estão associados a polissomos. Porém, análises de sequenciamento da proteína NAD9, extraída do complexo I mitocondrial, em batata, revelou somente a versão "editada" da proteína. Estes resultados sugerem que, caso sejam formados polipeptídeos a partir da tradução dos transcritos parcialmente editados, estes são rapidamente degradados e/ou não são incorporados ao complexo I, da membrana interna mitocondrial (Lu e Hanson, 1996). Phreaner et al., (1996), estudando transcritos totalmente editados e parcialmente editados do gene *rps12* em milho, revelaram, por análises imunológicas, que transcritos não editados ou parcialmente editados são de fato traduzidos, mas seus produtos protéicos não se acumulam nos ribossomos mitocondriais. Estes polipeptídeos talvez funcionem como proteínas de ligação ao RNA, para facilitar a excisão de introns e o dobramento das moléculas de RNA, necessária à formação de sua estrutura secundária funcional. As mesmas análises foram feitas para os transcritos do gene *rps12* em petunia, onde se constatou que múltiplas formas da proteína RPS12 existem nesta planta, assim como em

outras espécies. Porém, em petúnia, os polipeptídeos gerados por transcritos parcialmente editados se acumulam em ribossomos (Lu et al., 1996).

Estudos de edição dos transcritos do gene *rps13* presentes na mitocôndria de milho indicaram que apenas uma pequena proporção do total de cDNAs analisados estava parcialmente editada. Análises imunológicas demonstraram que o produto de tradução de transcritos totalmente editados se acumula nos ribossomos, porém o produto de tradução dos transcritos parcialmente editados não foram detectados na fração ribossomal, e nem no sobrenadante pós-ribossomal, sugerindo que eles são instáveis (Williams et al., 1998).

Sugere-se que a edição do RNA poderia ser utilizada para a regulação da expressão gênica. Por exemplo, a edição do RNA poderia ser modulada durante o desenvolvimento de maneira sítio-específica, de forma a produzir diferentes polipeptídeos sob várias condições ambientais ou diferentes estágios de desenvolvimento. Pesquisas feitas com os genes *nad3*, *atp9* e *cox2* revelaram que predominam mRNAs incompletamente editados para alguns genes mitocondriais de planta, e que o grau de edição pode mudar de acordo com as condições de crescimento e desenvolvimento (Grosskopf e Mulligan, 1996).

O processo de edição é essencial para a correta expressão de praticamente todos os genes mitocondriais já analisados, uma vez que afeta todos os mRNAs já estudados e vários RNAs estruturais. Como a edição é um processo de extrema importância, chegou-se a conclusão que, antes de analisar-se a função de uma *orf*, é necessário verificar se sua sequência é editada, pois a identificação de sítios de edição em uma *orf* é uma indicação de que ela corresponde a um gene funcional.

#### 2.2.4. Transcrição dos genes mitocondriais de plantas superiores

O desenvolvimento recente de sistemas *in vitro* de iniciação da transcrição e processamento de tRNAs tem produzido detalhes interessantes e intrigantes sobre a regulação transcricional e pós-transcricional em mitocôndria de plantas.

Muitas das regiões codificadoras são separadas por vários kilobases de sequências intergênicas. Esta organização implica em que a maior parte da informação codificada seja expressa como transcritos monocitrônicos com promotores individuais, como acontece por exemplo com os genes *atp9* (Grabau et al., 1990; Kaleikau et al., 1993), *cox1* (Kemmerer e Wu, 1990) e *cox3* (Gualberto et al., 1990). As frequentes recombinações genômicas, que ocorrem no DNAmT de plantas superiores, podem colocar próximos, em umas espécies, genes que estão distantes em outras espécies.

Genes que estão localizados muito próximos quase sempre são cotranscritos. Os genes *nad3-rps12* estão bastante próximos e são cotranscritos em *Pinus sylvestris* L. (Karpinska et al., 1995), *Triticum aestivum* (trigo) e *Zea mays* L. (milho) (Gualberto et al., 1988). Também são cotranscritos os genes: *cox3-orfB* do genoma mitocondrial de *Heliantus annuus* (girassol) (Quagliariello et al., 1990), *rrn18S-rrn5S* em *Zea mays* (Maloney e Walbot, 1990), *rpl5-nad3* em *O. berteriana* (Schuster, 1993), *orf87-nad3-rps12* e *orf87-nad3-nad1/A* em *Nicotiana sylvestris*. Os "clusters" *orf87-nad3-nad1/A* e *orf87-nad3-rps12* do DNAmT de *N. sylvestris* foram, provavelmente, gerados por eventos de recombinação homóloga entre a região intergênica de *nad3-rps12* e a região 3' de um gene ancestral *nad1* (Gutierrez et al., 1997). São cotranscritos os genes *nad6-atp6*, em milho (Haouazine-Takvorian et al., 1997), *nad6-nad1/D*, em trigo (Haouazine et al., 1993), *rps4-nad2/A-nad2/B* em *A. thaliana* (Lippok et al., 1996), *orf25-cox3* em *Oryza sativa* (arroz)

(Liu et al., 1992) e *trnA(GCU)-trnF(GAA)-trnP(UGG)* em *Solanum tuberosum* (batata) (Remacle e Marechal-Drouard, 1996).

A presença de numerosas unidades transcricionais implica na existência de muitos promotores individuais, cuja existência tem sido confirmada através de vários trabalhos. Alguns genes possuem promotores múltiplos, os quais estão ativamente envolvidos na transcrição, e podem estar sendo usados para uma regulação diferencial da respectiva atividade gênica (revisito por Binder et al., 1996). Nakazono et al., (1996b) identificaram vários sítios de iniciação da transcrição no gene *atp1* do DNAm de arroz.

O padrão de transcrição de genes individuais pode também ser complicado pela presença de várias cópias do gene no genoma. O gene *atpA* pode ser encontrado em múltiplos contextos de sequências no DNAm de soja, devido a presença nele de duas repetições com capacidade recombinatória. Analisando-se o padrão de transcrição deste gene através de experimentos de "Northern Blotting" e ensaios de proteção de nuclease S1, verificou-se a existência de múltiplos transcritos com uma extremidade 3' única e uma população heterogênea de extremidades 5' (Chanut et al., 1993).

Como já discutido, uma grande parte dos genomas mitocondriais de plantas superiores existe como moléculas subgenômicas, provavelmente devido a recombinação entre as sequências repetidas. Este fato possibilita que domínios subgenômicos, replicando independentemente, resultem na variação do número de cópias de alguns genes. Muise e Hauswirth (1995), através de hibridizações com o DNAm de milho digerido ou intacto, demonstraram que há diferenças gene-específicas no número de cópias entre dois genótipos de milho, e que as taxas transcricionais destes genes crescem em relação direta ao número de cópias do gene.

### 2.2.5. Promotores de genes mitocondriais de plantas superiores: sequência e atividade transcricional

Até o presente não foi possível transformar-se mitocôndrias de plantas, de modo que não pôde-se realizar, por estas vias, estudos de expressão gênica, assim como estudos da força do promotor.

Com o intuito de identificar os sítios de iniciação da transcrição na mitocôndria de trigo, as extremidades 5' de RNAs nascentes foram marcadas pela técnica "in vitro capping", e as sequências de quatro mRNA foram determinadas. Um motivo conservado foi descrito na região 5' destes genes (Covello e Gray, 1991). O desenvolvimento dos sistemas de transcrição *in vitro* para mitocôndria de diferentes espécies de plantas permitiu a determinação detalhada da influência de nucleotídeos individuais na atividade promotora. A inspeção das sequências nestes sítios de iniciação revelou sequências conservadas, as quais são sítios promotores da transcrição. O motivo CRTA (R=purina) está presente em várias monocotiledôneas e dicotiledôneas, sendo esta a sequência promotora mais conservada entre as plantas superiores (revisto por Binder et al., 1996). Este motivo CRTA já foi encontrado na região 5' dos genes *rrn26* e *trnM* do DNAm<sub>t</sub> de arroz (Nakazono et al., 1995), do gene *rrn18* do DNAm<sub>t</sub> de ervilha, batata e *A. thaliana* (Giese et al., 1996) e em vários sítios de iniciação estudados em *O. berteriana* (Binder e Brennicke, 1993).

Estudos de deleção, mutação pontual, entre outros, mostraram que, em adição ao tetranucleotídeo conservado, outras sequências localizadas na região 5' dos genes em monocotiledôneas são importantes para a formação de um promotor eficiente, incluindo uma região rica em bases purina localizada 15 pb aquém do sítio de iniciação da transcrição (revisto por Binder et al., 1996). Em dicotiledôneas, assim como em monocotiledôneas,

também há uma região A/T-rica, e o motivo CRTA está presente em uma sequência nonanucleotídica altamente conservada, a qual possui o primeiro nucleotídeo transcrito (Brown et al., 1991; Binder e Brennicke, 1993; revisto por Binder et al., 1996; Giese et al., 1996; Caoile e Stern, 1997).

Estabeleceu-se um sistema de transcrição *in vitro* a partir de mitocôndrias de ervilha. Através dele verificou-se que a iniciação da transcrição das construções testadas ocorreu a partir de promotores de genes que codificam proteínas, assim como de genes que codificam tRNAs, indicando um modo comum de iniciação da transcrição para diferentes tipos de RNA. O sistema reconheceu também moldes heterólogos, indicando um papel geral do motivo nonanucleotídico dentro de promotores mitocondriais de mono e dicotiledôneas. Além disso, estudos da estrutura do promotor, realizados através de análises de deleção, indicaram que sequências localizadas a mais de 25 nucleotídeos, antes do início da transcrição, também são importantes para o evento de iniciação (Binder et al., 1995). O gene *atp9* de batata possui um padrão simples de transcrição, pois identificou-se um único transcrito nos experimentos de “Northern Blotting”. Seu sítio de iniciação da transcrição foi determinado, não possuindo, a sequência ao redor, qualquer homologia com as sequências consensos de promotores mitocondriais. Discute-se, assim, a existência de mais um mecanismo de transcrição na mitocôndria de plantas (Lizama et al., 1994).

Experimentos de transcrição “run-on” mitocondriais foram usados para determinar a taxa transcricional de nove genes mitocondriais de milho, a saber: *rps12*, *rrn26*, *atp6*, *rrn18*, *cox2*, *atp $\alpha$* , *atp9*, *cox3* e *cob* (Muise e Hauswirth 1992). Detectou-se uma variação de 15 vezes entre as taxas transcricionais. Posteriormente, analisou-se se a taxa transcricional de cada gene era dependente do genótipo citoplasmático, ou do tecido a partir

do qual as mitocôndrias foram isoladas. Não se detectou diferenças tecido-específicas nas taxas transcricionais, mas a variação significativa da força do promotor, de pelo menos um dos genes, foi dependente do genótipo citoplasmático. O mesmo experimento foi feito para outros setes genes mitocondriais (*rrn18*, *rrn26*, *atp1*, *atp6*, *atp9*, *cob* e *cox3*) também a partir de mitocôndrias de milho, obtendo-se o mesmo resultado. Encontrou-se uma variação na taxa de transcrição de aproximadamente 14 vezes, e concluiu-se que a força do promotor é o principal determinante desta variação (Mulligan et al., 1991). No primeiro trabalho o gene *rps12* foi o mais transcrito, enquanto que no segundo os genes mais transcritos foram os que codificam os rRNA 18S e 26S. Mulligan et al., (1991) concluíram que os processos pós-transcricionais também são importantes na modulação da abundância de mRNAs.

#### **2.2.6. Processamento dos transcritos mitocondriais de plantas superiores**

A marcação específica da extremidade 5' do RNA através de experimentos de capeamento *in vitro* tem permitido a distinção entre a terminação 5' derivada de iniciações *de novo*, daquelas oriundas de eventos de processamento na extremidade 5'. Este método baseia-se na marcação específica das extremidades 5' nascentes, as quais são polifosforiladas nos transcritos primários, com GTP marcado radioativamente, através da enzima guanidiltransferase. Com a utilização desta técnica verificou-se que a extremidade 5' de vários genes, determinadas por ensaios de "extensão de primers" e digestão com nuclease S1 correspondiam, de fato, a sítios genuínos de início da transcrição, e não a sítios de processamento. Estes resultados mostraram que o processamento da extremidade 5' em mitocôndria de plantas não é obrigatório. Análises de "extensão de primer" indicaram que a extremidade 5' do transcrito maduro do rRNA 26S é criado pelo simples início da

transcrição, não havendo qualquer processamento posterior nesta região (revisado por Binder et al., 1996).

Os diferentes passos de processamento na maturação do RNA em mitocôndrias de plantas constituem níveis potenciais da regulação pós-transcricional na organela. Em mitocôndrias e cloroplastos de plantas, os mRNA e rRNA não possuem a estrutura “cap” na extremidade 5’, e os mRNA não são poliadenilados em suas extremidades 3’. Ocorrem clivagens endonucleolíticas na terminação 5’ dos rRNAs, nas terminações 3’ e 5’ dos tRNAs e em precursores dos mRNA.

#### **2.2.6.1. rRNA**

A organização e a estrutura dos genes que codificam rRNAs da mitocôndria de plantas são diferentes daquelas de animais e fungos. Os rRNAs de plantas são maiores e contém um rRNA 5S na subunidade ribossômica maior (Leaver e Harney 1976). Os genes que codificam rRNA 18S e 5S foram encontrados em estreita ligação, no DNAm de trigo e de outras espécies analisadas, estando, entretanto, bem distantes e em sentido oposto ao gene que codifica o rRNA 26S (Cunningham et al., 1976; Brennicke et al., 1985; Manna e Brennicke 1985; Leujene et al., 1987; revisado por Falconet et al., 1988).

Maloney e Walbot (1990) examinaram a transcrição dos genes para os rRNA 18S e 5S da mitocôndria de milho, como um passo inicial na busca da elucidação do mecanismo de transcrição e processamento da mitocôndria de plantas. Experimentos de “Northern Blotting” indicaram que estes dois genes são cotranscritos e, através de análises de proteção por endonuclease S1, verificou-se que este transcrito maior sofre processamento

endonucleolítico em vários pontos, tendo sido determinado as extremidades 5' e 3' dos transcritos monocistrônicos obtidos após maturação do transcrito primário.

Muitas terminações 5' derivam de eventos de processamento e as sequências ao redor destas terminações foram investigadas com o objetivo de se identificar sinais potenciais de processamento. Incluindo as sequências terminais dos genes para rRNA, dois blocos de sequências estão conservados nestas regiões e atuam como sinais potenciais de processamento (Maloney et al., 1989; Schuster e Brennicke, 1989). Sítios de processamento no 5', pelo menos nos rRNA, muito provavelmente derivam de clivagens endonucleolíticas nestas regiões sinalizadoras conservadas, e devem, portanto, gerar produtos detectáveis em ensaios *in vitro*. Em diferentes espécies de plantas, o rRNA 18S é sintetizado a partir de promotores que estão bem aquém da sequência, requerendo, portanto, processamento na região 5' para a remoção de 25-120 nt. Em trigo, um gene para tRNA, que está 1 nt anterior à região codante do rRNA 18S, é usado como sinal de processamento na maturação simultânea das extremidades 3' do tRNA e da região 5' do rRNA18S (Maloney e Walbot, 1990; Gray et al., 1992).

Em diferentes espécies vegetais observou-se uma elevada similaridade de sequência, entre a região 5' terminal do transcrito maduro do gene rRNA26S, e a mesma região do transcrito do gene *atp9*. Este fato sugeriu que esta sequência conservada talvez seja responsável por guiar uma atividade específica de processamento (Schuster e Brennicke, 1989). Observou-se que todos os rRNAs mitocondriais maduros e precursores contém um tetranucleotídeo, AAU(A)C na sua extremidade 5'. Esta sequência é também vista, na mesma posição, em vários outros mRNAs de plantas, de modo que propõe-se uma função de iniciação da transcrição e/ou processamento para tal sequência (Maloney et al., 1989).

### 2.2.6.2. mRNA

Na mitocôndria de plantas e nos cloroplastos os mRNA não são poliadenilados, necessitando, assim, outros mecanismos para sua estabilização. Provavelmente é necessário um processamento extensivo da região 3', uma vez que, regiões adicionais não codificadoras, são muitas vezes incluídas nos transcritos. Terminais 3' múltiplos são observados somente excepcionalmente, de modo que as extremidades únicas vistas em unidades individuais de transcrição sugerem fatores regulatórios específicos para estas regiões (revisto por Binder et al., 1996). A inspeção das sequências presente nos arredores das terminações 3' identificou um grupo de 15 nucleotídeos conservados, que se dobram em uma estrutura secundária do tipo "stem-loop", imediatamente antes do término dos transcritos dos genes *cox2* e *atp1* de *O. berteriana* (Schuster et al., 1986). A análise de sequências presentes na região 5' de outras terminações 3' mapeadas mostraram que estas sequências também possuem uma capacidade para se dobrar em estruturas "stem-loop", como foi verificado em milho, arroz, ervilha, petunia e sorgo (revisto por Binder et al., 1996).

São necessárias clivagens exonucleolíticas no terminal 3' dos rRNA e mRNA. As estruturas secundárias semelhantes a "loops" que ocorrem no terminal 3' dos mRNAs são sinais potenciais para digestão endonucleolítica adicional ou para atenuação da digestão exonucleolítica 3'→5', funcionando, assim, como estabilizadores dos transcritos, ou ainda para a terminação da transcrição (revisto por Binder et al., 1996). Dombrowski et al., (1997) mostraram, através de ensaios de transcrição *in vitro*, que as sequências invertidas repetidas responsáveis pelos "loops", presentes nas extremidades 3' do mRNA do gene

*atp9*, atuam como sinais de processamento exonucleolítico 3'→5' e como sinais estabilizadores dos transcritos precursores, mas não como terminadores da transcrição.

### 2.2.6.3. tRNA

Sistemas de processamento *in vitro* desenvolvidos para lisados mitocondriais de trigo (Hanic-Joyce e Gray, 1990) e *O. berteriana* (Marchfelder et al., 1990), e extratos mitocondriais de batata (Marchfelder e Brennicke, 1994) e ervilha (Marchfelder et al., 1996) confirmaram que a mitocôndria de plantas possui a capacidade de excisar moléculas de tRNA de transcritos maiores. O processamento do tRNA envolve clivagens endonucleolíticas por enzimas em seu terminal 5' (RNase P) e em seu terminal 3' (3' endonuclease). A enzima tRNA nucleotidil transferase adiciona a sequência CCA ao terminal 3' do tRNA em maturação. Análises do processamento *in vitro* de extratos mitocondriais de trigo e batata demonstraram que tRNAs de origem do cloroplasto, integrados no DNAm<sub>t</sub>, são corretamente reconhecidos e processados pela RNase P e sofrem o processamento 3' (Hanic-Joyce e Gray, 1990; Marchfelder e Brennicke, 1993; Marchfelder e Brennicke, 1994). tRNA adicionais são importados do citoplasma, mas ainda não sabe-se se eles sofrem o processamento dentro ou fora da organela (revisto por Binder et al., 1996).

O processamento de tRNA mitocondriais de plantas talvez seja um regulador para o funcionamento dos tRNA mitocondriais, dos tRNAs de origem do cloroplasto e daqueles importados do núcleo. O processamento é controlado por diferentes fatores inerentes ao próprio tRNA, como pode ser deduzido da eficiência variável de excisão. O processamento

do tRNA<sup>Phe</sup>, por exemplo, é regulado pelo nível de edição do precursor. Precursores não editados não são reconhecidos pela RNase P e não são processados, já as moléculas precursoras editadas são rapidamente convertidas em moléculas maduras (Marchfelder et al., 1996).

### 2.3. DNAm<sub>t</sub> de *Marchantia polymorpha*

O DNAm<sub>t</sub> da briófito *M. polymorpha* foi analisado em microscopia eletrônica, mapeado com base nos sítios de cortes de endonucleases de restrição e completamente sequenciado (Oda et al., 1992). Tais estudos determinaram que este DNA mitocondrial é representado por uma molécula circular única de 186.608 pares de bases, sem repetições recombináveis, portanto incapaz de gerar moléculas subgenômicas ou formas isômeras. Este DNAm<sub>t</sub> também não apresenta inserções de segmentos de DNAs exógenos, originários do cloroplasto ou do núcleo, e os transcritos de seus genes não sofrem edição. Além disto ele apresenta organização gênica semelhante aos operons bacterianos. Seus genes que codificam proteínas ribossômicas formam dois grupos principais, sendo assim muito similares, quanto a sua organização, aos operons de proteínas ribossômicas de *E. coli* (operons *str* e *S10-spc-α*) (Takemura et al., 1992). Estas características sugerem que o genoma mitocondrial da briófito provavelmente se assemelha à forma primitiva do genoma mitocondrial de plantas, originado a partir de um endossimbionte (Gray, 1989; Oda et al., 1992).

O conhecimento da informação genética do genoma mitocondrial das plantas avançou consideravelmente com a determinação da sequência genômica completa do

DNAmt de *M. polymorpha* (revisto por Schuster e Brennicke, 1994) o que mostra a grande importância que teve o estudo do genoma mitocondrial desta briófitas. Verificou-se que este genoma apresenta praticamente todos os genes já descritos na mitocôndria de plantas superiores, possuindo, estes genes, um alto grau de identidade entre as diversas espécies do reino vegetal. Quando da publicação da sequência do genoma mitocondrial desta briófitas, 28 *orfs* permaneceram com suas funções não identificadas, devido a ausência de similaridade a qualquer sequência mitocondrial, presente nos bancos de dados.

Estas *orfs* mitocondriais são quadros de leitura aberta, assim caracterizados por apresentarem um codon de iniciação e um codon de terminação. Este dado, somado ao fato destas sequências apresentarem preferencialmente codons que obedecem ao "codon usage" de genes mitocondriais da briófitas (conteúdo de C+G na primeira, segunda e terceira posição do codons de  $42 \pm 10.9\%$ ,  $37 \pm 13.2\%$  e  $26.4 \pm 9.4\%$ , respectivamente - Oda et al., 1992), tornam tais *orfs* fortes candidatas a genes funcionais. Algumas destas *orfs* já foram confirmadas como genes e tiveram suas funções elucidadas, o que faz com que as outras *orfs* sejam fortes candidatas a serem reconhecidas como genes funcionais. As *orfs* que tiveram sua função elucidada são: *orf322*, *orf169*, *orf509*, *orf228* e *orf277*, as quais encontram-se agrupadas no DNAmt da briófitas. Estas *orfs* codificam 4 proteínas homólogas a polipeptídeos envolvidos na biogênese do citocromo c, como descrito para os genes homólogos à elas, os quais estão presentes em *R. capsulatos*.

## 2.4. Características evolutivas do genoma mitocondrial de plantas

Fortes evidências apontam na direção de uma origem endossimbiótica para a mitocôndria e o cloroplasto, sendo que as duas organelas originaram-se a partir de procariotos distintos. Segundo a hipótese endossimbiótica, as organelas teriam se originado a partir da evolução de progenitores procarióticos, que viviam em associação simbiótica com a célula hospedeira nucleada. Não é conhecido se a origem das organelas é mono ou polifilética, existindo argumentos contra e a favor de ambas as origens. A grande conservação genética, em nível da função mitocondrial, do conjunto de genes e de sua sequência de bases, entre o DNA mitocondrial de diversos organismos, favorece a hipótese da origem monofilética para as mitocôndrias (Gray, 1989a; 1989b; Gray et al., 1989; Oda et al., 1992). A **Figura 2** mostra uma árvore filogenética da provável evolução das mitocôndrias e cloroplasto a partir de uma bactéria ancestral.

Em recente revisão, Gray et al. (1999) apresentaram que estudos recentes de eucariotos unicelulares (protistas) tem fornecidos evidências que contestam a tradicional teoria da endossimbiose serial. Esta teoria defende que as mitocôndrias são os descendentes diretos de um endossimbionte eubacterial que se estabeleceu, em um estágio inicial da evolução, em uma célula hospedeira com núcleo, mas amitocondriada. Os estudos recentes indicam que a mitocôndria surgiu de um ancestral comum a todos eucariotos existentes e levantou a possibilidade de que esta organela tenha se originado essencialmente no mesmo tempo que o componente nuclear da célula eucariótica, ao contrário de ter surgido em um evento separado e subsequente.

Através de estudos extensivos de comparações de sequências, tamanho do genoma, conteúdo e organização gênica do DNAm, entre diversas espécies vegetais,

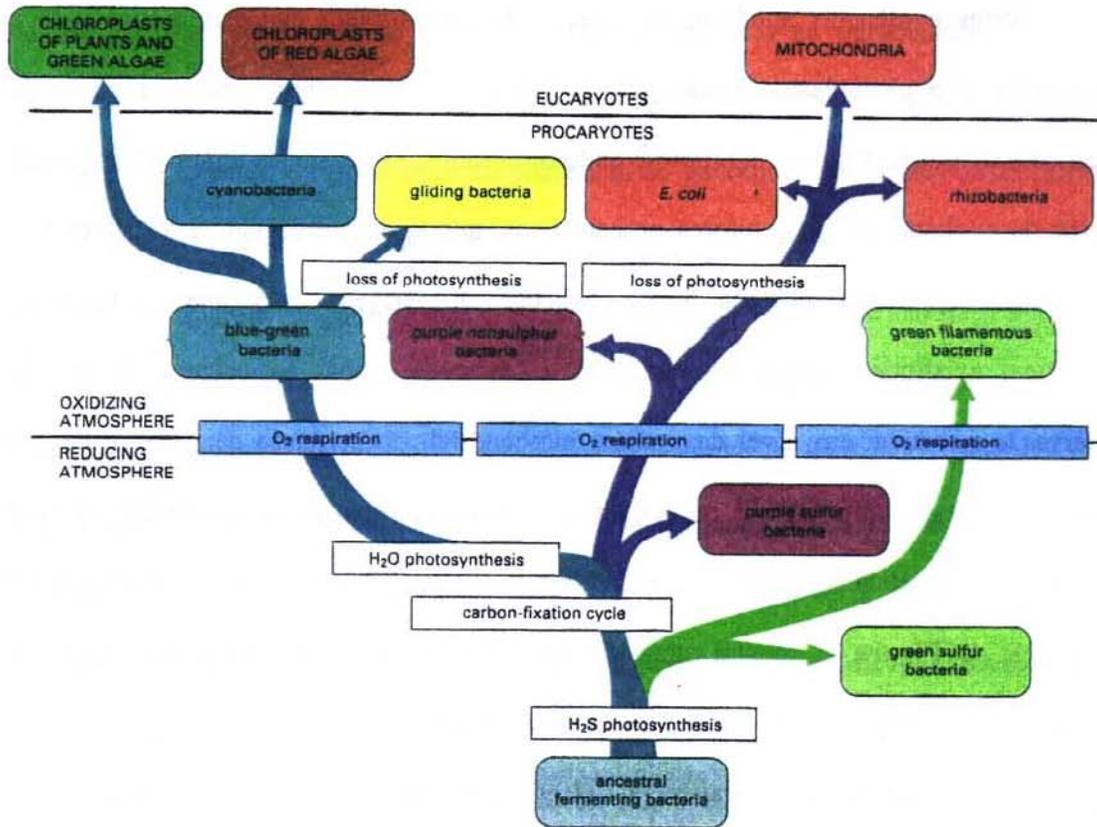


Figura 2: Esquema da árvore filogenética da possível evolução da mitocôndria, do cloroplasto e de seus ancestrais bacterianos (Alberts et al., 1994).

concluiu-se que o genoma mitocondrial de plantas varia enormemente em tamanho e organização dos genes, porém apresenta uma baixa taxa de substituição de nucleotídeos (mutação) quando comparado ao genoma do cloroplasto. Desta forma, o genoma mitocondrial de plantas possui grande capacidade de evoluir rapidamente em estrutura, porém lentamente em sequência. Tal fato resulta em grande conservação da estrutura primária (sequência de nucleotídeos) dos genes entre diferentes espécies de plantas (Palmer, 1990), sendo a organização gênica mitocondrial completamente diferente de uma espécie para outra, devido a elevada taxa de recombinações.

Ilustrando o processo evolutivo do DNAmT de plantas superiores, encontra-se o trabalho de Palmer e Herbon (1988). Estes autores, estudando seis espécies do gênero *Brassica*, demonstraram que o DNAmT destas espécies era constituído por um mesmo grupo de sequências. As sequências se ordenavam diferentemente em cada uma das espécies, como resultado, principalmente, de inversões e rearranjos aleatórios ocorridos nos genomas.

## **2.5. Estratégias para a descoberta de novos genes mitocondriais**

Sabe-se que mudanças no conteúdo gênico não é um componente importante responsável pela variação de tamanho entre os genomas mitocondriais de plantas (revisto por Palmer, 1990). Desta forma, entre as diferentes espécies, há pouca variação da capacidade codificadora do DNAmT.

Observa-se que ocorre uma diferença entre o número de polipeptídeos resultante de síntese protéica organelar (20 polipeptídeos ou mais), visualizados como bandas em gel após eletroforese, e o número de proteínas conhecidas através da clonagem de genes

mitocondriais em Angiospermas. Desta forma, espera-se que no futuro mais genes codificadores de proteínas mitocondriais sejam identificados no DNAm<sub>t</sub> de plantas superiores (revisto por Breiman e Galun, 1990).

A identificação de novos genes mitocondriais em plantas tem sido feita através de diferentes estratégias. Por exemplo, no final da década de 80 utilizou-se mapas de transcrição, onde coleções de clones do DNAm<sub>t</sub>, representando o genoma mitocondrial completo, foram usadas como sondas para hibridizações com o RNAm<sub>t</sub>. Os fragmentos que se hibridizavam eram analisados em detalhes, pois podiam representar novos genes. Além desta estratégia, também foram estudados mutantes mitocondriais, onde a caracterização de sequências alteradas do DNAm<sub>t</sub> em mutantes levou a identificação de novos genes funcionais (Newton, 1988).

O sequenciamento de fragmentos do DNAm<sub>t</sub> de plantas e comparação com sequências mitocondriais, nucleares ou do DNAct de outros organismos também é um caminho para a identificação de novos genes mitocondriais em plantas. Este foi o procedimento adotado para o estudo do genoma de *M. polymorpha* (Oda et al., 1992).

Bonnard e Grienenberger (1995), identificaram uma nova *orf* em trigo, através do estudo das regiões transcritas do genoma mitocondrial do trigo. O RNAm<sub>t</sub> total marcado radioativamente foi usado como sonda em hibridização com uma coleção de clones do DNAm<sub>t</sub> representando o genoma completo. Os clones positivos, que não codificavam genes mitocondriais já conhecidos, foram analisados em detalhes. Um fragmento de 3.7 kb identificado foi sequenciado, revelando uma nova *orf*. Após comparações com sequências nos bancos de dados, observou-se que a nova *orf* identificada em trigo apresentava similaridade com o gene bacteriano *helC*, envolvido na síntese do citocromo c, e com a

*orf228*, com função até então desconhecida, presente no genoma mitocondrial de *M. polymorpha*.

As hibridizações heterólogas também são um recurso bastante utilizado na identificação de novos genes no genoma mitocondrial de plantas superiores. Estes estudos tem sido feitos com sucesso, mesmo quando as sondas heterólogas provém de organismos de reinos diferentes (Dawson et al., 1988). Resultados melhores podem ser esperados, então, com o uso de sondas obtidas a partir de diferentes espécies do mesmo reino. Em plantas observa-se que, mesmo entre espécies evolutivamente distantes, há elevada conservação das sequências gênicas.

## **2.6. Estratégia utilizada neste trabalho para a descoberta de novos genes mitocondriais**

Neste trabalho, a busca de novos genes mitocondriais foi efetuada adotando-se, como estratégia, o emprego de hibridizações heterólogas. Seis *orfs* de *M. polymorpha* (*orf86a*, *orf99*, *orf109*, *orf136*, *orf167* e *orf207*) foram utilizadas como sondas em hibridizações que visaram verificar a conservação delas no DNAmT de seis espécies vegetais. Estas espécies foram escolhidas de forma que fossem distantemente relacionadas e constituíssem uma amostra representativa da diversidade das Angiospermas.

Esperava-se que as *orfs* presentes no DNAmT da briófitas, e que ainda permanecem com a função desconhecida, fossem novos genes conservados entre as plantas superiores, pelos seguintes fatores:

1. Estas *orfs*, por definição, apresentam um codon de iniciação e um codon de terminação para tradução.

2. Os codons utilizados estão em consonância com o “codon usage” dos genes mitocondriais da briófitas.
3. Há evidências de que ainda há genes mitocondriais em plantas superiores a serem descobertos.
4. Existe elevada conservação da sequência de bases entre os mesmos genes presentes em diferentes espécies de plantas.

Inicialmente as seis *orfs* foram caracterizadas quanto a sua conservação entre as plantas superiores, o que forneceu evidências à sua classificação ou não como genes. Quatro das seis *orfs* (*orfs 86a*, *orf167*, *orf99* e *orf207*) revelaram-se conservadas no DNAmT das espécies vegetais analisadas.

Dentre estas, a *orf167* despertou interesse por apresentar homologia com sequências presentes no DNAmT de batata, coix, ervilha, milho e soja. Este resultado determinou o estudo detalhado do fragmento homólogo à *orf167* presente no DNAmT de coix. Esta planta foi escolhida como modelo, devido ao sinal intenso verificado na autoradiografia, obtido após a hibridização da *orf167* com o DNAmT desta espécie. Este sinal intenso indicou que a sequência do DNAmT de coix, homóloga à *orf*, era bastante similar à sequência da *orf167*, fato que facilitou seu isolamento e estudo, neste trabalho.

### 3. OBJETIVOS

- ◆ Estudo da conservação das *orf86a*, *orf99*, *orf109*, *orf136*, *orf167* e *orf207*, originárias do DNAm de *Marchantia polymorpha*, no genoma mitocondrial de alfafa, batata, coix, couve-flor, ervilha, milho e soja.
- ◆ Clonagem do fragmento mitocondrial identificado em *Coix lacrima-jobi* L, homólogo a *orf167* de *M. polymorpha*.
- ◆ Estudo da estrutura e expressão dos genes presentes neste fragmento.
- ◆ Estudo da conservação do fragmento homólogo à *orf167* de *M. polymorpha*, presente no DNAm de coix, em diferentes espécies vegetais.



## 4. MATERIAL

### 4.1. Material vegetal

As espécies escolhidas para extração de DNAm foram selecionadas de forma que representassem os dois grandes subgrupos das Angiospermas: as monocotiledôneas e as dicotiledôneas. Outro critério empregado foi a escolha de espécies pertencentes a famílias distantes, de maneira que pudessem corresponder a uma amostragem representativa da diversidade do grupo, dentro de nossas possibilidades de trabalho. Além disso, considerou-se também a disponibilidade de material vegetal, facilidade na realização das extrações e rendimento em DNAm adequado aos experimentos.

Seguindo estes critérios, entre as monocotiledôneas escolheu-se as espécies *Coix lacryma jobi* L. (coix) e *Zea mays* (milho) (híbrido simples comercial AGF352). Representando as dicotiledôneas foram escolhidas espécies de três grupos distantes: Leguminosas, Solanáceas e Brássicas. Assim, selecionou-se *Glycine max* (soja) (variedade CV-IAC- 5), *Pisum sativum* (ervilha) (variedade MIKADO), *Medicago sativa* (alfafa) (adquirida no comércio local); *Solanum tuberosum* (batata) (adquirida no comércio local) e *Brassica oleracea* (couve flor) (adquirida no comércio local).

Utilizou-se também uma briófito do mesmo gênero da *Marchantia polymorpha*, denominada *Marchantia chenopoda*. *M. chenopoda* é uma espécie brasileira, abundantemente encontrada em São Paulo e morfológicamente muito semelhante a *M. polymorpha*. Esta espécie foi coletada no Instituto de Botânica, São Paulo - SP, sob a orientação do Dr. Daniel Moreira Vital.

## 4.2. Oligonucleotídeos

Todos os oligonucleotídeos utilizados para as reações de amplificação de DNA, síntese e amplificação de cDNA estão listados na **Tabela 1**.

## 4.3. Sondas

Foram usadas como sondas heterólogas 6 *orfs* amplificadas por PCR a partir do DNA total de *M. polymorpha*. Para escolha destas *orfs*, foram feitas pesquisas em bancos de dados, utilizando-se a sequência de várias *orfs* mitocondriais da *M. polymorpha*. Estas análises revelaram que as seis *orfs* escolhidas permaneciam com suas funções desconhecidas, sendo elas: *orf86a*, *orf99*, *orf109*, *orf136*, *orf167*, e *orf207*. A localização destas *orfs* no mapa físico da briófito é dada na **Figura 3**.

A				
orf	POSIÇÃO DO OLIGO	T <sub>m</sub> calculada	T <sub>m</sub> usada	SEQUÊNCIA
86a	5' dentro da <i>orf</i> 3' fora da <i>orf</i>	61,2 °C 59,5 °C	56 °C	5' GAA ACC TTA GGG CAT TGG CTT CTT C3' 5' GAC TAT AAG GAC AGG GGA GAG CAC G3'
99	5' dentro da <i>orf</i> 3' fora da <i>orf</i>	61,7 °C 60,2 °C	57 °C	5' GCA GGC ACA GGT AAT GAA AAC GAA G3' 5' GAA CAT AAC CGT CCC AGG GTA ATG A3'
109	5' fora da <i>orf</i> 3' fora da <i>orf</i>	58,9 °C 58,9 °C	53 °C	5' TTA AGG AAC ACT TGG GAC TAC CGA A3' 5' AAG AGA ATC AAA CGC ACA GAA AAGC3'
167	5' dentro da <i>orf</i> 3' fora da <i>orf</i>	57,7 °C 58,2 °C	55 °C	5' AGT TGG AGG AGA TAG GAT TTC GTG T3' 5' GTT ACT TCT TTT GCG GCT GTT TTC T3'
136	5' fora da <i>orf</i> 3' fora da <i>orf</i>	56,9 °C 57,2 °C	45 °C	5' CGT TTT TCG GCG AGT CTA TGT CAT T3' 5' TTA GAG AAG CAA CCA GTG GCA ATA T3'
207	5' fora da <i>orf</i> 3' dentro da <i>orf</i>	62,4 °C 62,0 °C	58 °C	5' TAT GCC GCT TTG CTG AAT GTT TTG T 3' 5' TTC ATT GGT AAG TTG GTG GAC GAC C3'

B				
cDNA	POSIÇÃO DO OLIGO	T <sub>m</sub> calculada	T <sub>m</sub> usada	SEQUÊNCIA
OLIGO MAP5	5' dentro do gene <i>nad3</i> / amplifica 3'→5' em relação ao gene	63.4 °C	61.0 °C	5'CGA CTT CTG GCA TCA CCG 3'
OLIGO FNAD3	5' fora do gene <i>nad3</i> / amplifica 5'→3' em relação ao gene	62.0 °C	61.0 °C	5'GCG AGA GAA CGA AGT GGG 3'
OLIGO DNAD3	5' dentro do gene <i>nad3</i> / amplifica 5'→3' em relação ao gene	61.7 °C	61.0 °C	5'GCT TTG GTG ATG TCG GAA T 3'
OLIGO DRPS12	3' dentro do gene <i>rps12</i> / amplifica 3'→5' em relação ao gene	61.2 °C	61.0 °C	5'CGT AAT AAG GGA AAG GAA GC 3'
OLIGO FRPS12	3' fora do gene <i>rps12</i> / amplifica 3'→5' em relação ao gene	63.2 °C	Não funcionou	5'GAG GCA TCT TCC ATT CAT TTA G 3'

C		
OLIGO COM CAUDA POLI T	Tm usada	SEQUÊNCIA
oligonucleotídeo 1	50°C	$\begin{array}{c} \text{Sst I} \\ \text{5' CTC GAG CTC CTG CAG T (16) 3'} \\ \text{Xho I} \qquad \qquad \text{Pst I} \end{array}$
oligonucleotídeo 2	50°C	$\begin{array}{c} \text{Sst I} \\ \text{5' CTC GAG CTC CTG CAG TT 3'} \\ \text{Xho I} \qquad \qquad \text{Pst I} \end{array}$

D		
OLIGO PARA AMPLIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO	Tm usada	SEQUÊNCIA
CV 72	55°C	5' ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG T 3'
CV 76	55°C	5' AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC C 3'

**Tabela 1.** Sequência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento calculada e empregada nas amplificações. A) oligonucleotídeos utilizados para amplificações das *orfs* mitocondriais da briófito *M. polymorpha*; B e C) oligonucleotídeos utilizados para síntese e amplificação dos cDNAs; D) oligonucleotídeos utilizados para amplificação de fragmentos clonados em plasmídeos.



---

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Escolha das *orfs* de *M. polymorpha*.

As 28 *orfs* de *M. polymorpha*, publicadas por Oda et al. (1992) como sequências sem homologia com nenhuma sequência gênica conhecida, foram comparadas com sequências presentes nos bancos de dados. Para tanto, as sequências de bases das *orfs* foram convertidas nas suas sequências de aminoácidos, e comparadas utilizando-se o programa BLAST (disponível pela internet, página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Foram selecionadas aquelas que permaneciam desconhecidas, não estavam localizadas em introns e apresentavam tamanho suficiente pra codificar um polipeptídeo. São elas : *orf86a*, *orf99*, *orf109*, *orf136*, *orf167* e *orf207*.

### 5.2. Desenho dos oligonucleotídeos

Para cada *orf* do DNAmT de *M. polymorpha* foi desenhado um par de oligonucleotídeos. A determinação da sequência dos oligonucleotídeos foi feita com base na sequência da *orf* ou em sequências vizinhas à *orf*, usando-se o programa OLIGOS. Estes oligonucleotídeos foram utilizados como iniciadores para a amplificação das *orfs*, através de reações de amplificação a partir do DNA total de *M. polymorpha*.

Para o desenho de oligonucleotídeos eficientes foram observadas algumas regras simples: todos eles possuíam aproximadamente 25 nucleotídeos de extensão, 50-60% de composição C+G e ausência de complementariedade de sequência na porção 3' terminal de cada par.

A sequência de bases dos oligonucleotídeos, sua  $T_m$  (temperatura de anelamento) calculada e a usada nas reações de PCR, e sua posição em relação a *orf* que amplifica, são dadas na **Tabela 1A**.

Para a determinação da temperatura de anelamento que seria empregada nas reações de amplificação para cada par de oligonucleotídeos, verificou-se a  $T_m$  de menor valor do par, e desta subtraíu-se de 2,2°C a 5,9°C, para a obtenção da temperatura de anelamento mais específica.

Utilizando-se o programa GENERUNNER (Hastings Software, Inc. 1994), desenhou-se cinco oligonucleotídeos, com tamanhos variando de 18 a 22 bases, que foram usados para a síntese e amplificação dos cDNAs. Quatro combinações tiveram por objetivo a confecção do cDNA da região codificadora da fita de mRNA, para posterior amplificação da fita por PCR, clonagem e sequenciamento. Um oligonucleotídeo tinha por objetivo o mapeamento da região 5' do mRNA, também através de síntese de cDNA desta região, amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento. As sequências foram escolhidas de modo que não formassem palíndromes, "hairpin loops", dímeros, "bulge loops" e "loops" internos. Analisou-se também, através do programa, todas as combinações de oligonucleotídeos para verificar a viabilidade de seu uso em pares. Na **Tabela 1** são mostradas as sequências destes oligonucleotídeos, as  $T_m$  calculadas e as  $T_m$  empregadas para amplificação dos cDNAs.

### 5.3. Extração de DNAm<sub>t</sub>

A metodologia usada foi baseada na descrita por Vedel e Quetier (1974). Para extração do DNAm<sub>t</sub> de milho, soja, ervilha e coix foram utilizadas plântulas germinadas no

escuro por 7 a 8 dias. As sementes foram plantadas em vermiculita autoclavada, em bandejas esterilizadas por UV. As plântulas foram regadas em dias alternados com água destilada autoclavada e tratadas diariamente com fungicida. Plântulas de alfafa foram adquiridas no comércio local. Utilizou-se tubérculos de batata e inflorescências de couve flor para a extração do DNAm.

As plântulas foram cortadas na base e lavadas em água fria para retirada do fungicida; os tubérculos foram descascados e cortados em cubos e as inflorescências foram picadas em pedaços pequenos. Toda a extração, até o passo de lise das mitocôndrias, foi feita mantendo-se sempre as soluções resfriadas em gelo, bem como toda a vidraria utilizada e o material vegetal. O tecido foi pesado (foram usados entre 200-250 g de tecido) e colocado imediatamente no liquidificador. A ele adicionou-se 700-800 ml de tampão A gelado (Tris-HCl 0,05M pH8, Manitol 0,3M, EDTA tetraNa 3mM, BSA 0,1% e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,028%) de forma a cobrir completamente os tecidos. Em seguida eles foram moídos em liquidificador 3 vezes, durante 5 segundos, na velocidade baixa,. O tecido macerado foi filtrado em Blutex, o qual é um tecido de “nylon” com poros de 50  $\mu$ m de diâmetro, seletivo para mitocôndrias. Centrifugou-se o filtrado a 1.400 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado, e passou por nova centrifugação a 10.400 x g por 30 minutos a 4°C. Com esta centrifugação as mitocôndrias foram sedimentadas. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido cuidadosamente com pincel, em 10ml de tampão. As mitocôndrias ressuspendidas foram colocadas em um frasco “Potter”, onde efetuou-se sua homogeneização. A esta solução adicionou-se, lentamente, 10mM de  $MgCl_2$  e 100  $\mu$ g/ml de DNase. Após 1 hora a 4°C adicionou-se à solução 3 volumes de tampão B frio (Tris 0,05M pH8,0, sacarose 0,3M, EDTA tetraNa 20mM) e centrifugou-se a

12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se suavemente o precipitado em 4 ml de tampão B frio e homogeneizou-se a solução de mitocôndrias no "Potter". O volume obtido foi dividido em dois gradientes de sacarose preparados em tampão C (Tris 0,05M pH8, EDTA tetraNa 20mM). Os gradientes foram formados por sacarose em duas concentrações: a 53% e 30%. Estes gradientes foram centrifugados a 110.000 x g por 1 hora a 4°C. Recuperou-se as mitocôndrias purificadas, as quais se alojaram na interface das duas concentrações de sacarose, e adicionou-se lentamente ao volume recuperado 4 volumes de tampão B frio. Centrifugou-se a 17.200 x g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 5 ml de tampão C. Adicionou-se 1 ml de Sarkosyl a 10% e 100 µg/ml de proteinase K. Após 30 minutos a temperatura ambiente, o lisado foi vertido em uma proveta contendo 10,5 g de CsCl, e o volume foi completado para 12,5 ml com tampão C. Em um tubo "Quick Seal" introduziu-se 150 µl de Brometo de Etídeo a 10 mg/ml e o lisado mitocondrial misturado ao CsCl. Este tubo foi selado e centrifugado a 140.000 x g por 36 horas a 20°C. O DNAmT foi retirado do tubo com o auxílio de uma pipeta "Pasteur", e o BET foi eliminado da solução de DNA através de quatro lavagens com 1 volume de Butanol saturado em água. A solução limpa foi passada para um tubo "Corex" e adicionou-se a ela 3 volumes de Etanol 70% gelado. Após 2 horas a -20°C, o DNA foi centrifugado a 5.800 x g por 15 minutos a 4°C. Descartou-se o álcool e secou-se o DNA, o qual foi ressuspendido em 400-800 µl de TE pH 8.0 (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0).

O DNAmT foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e 280nm. Em seguida, verificou-se a qualidade do DNA através da digestão do mesmo (1 µg) com enzima de restrição, e separação dos fragmentos através de eletroforese em gel agarose 0,8% a 80V

em tampão TAE 1X (40mM Tris Base, 2mM EDTA, 200mM Ácido Acético). Um DNAm<sub>t</sub> de boa qualidade, quando digerido, deve apresentar as bandas dos fragmentos obtidos bem separadas umas das outras, pois o DNAm<sub>t</sub> é relativamente pequeno. Isso faz com que ele, quando digerido, mostre uma diversidade de tamanho de fragmentos menor do que a apresentada por um DNA genômico digerido.

#### **5.4. Extração de DNAct**

A extração de DNA de cloroplasto (DNAct) foi feita a partir de plântulas de coix e milho. Dada a grande conservação do genoma do cloroplasto entre as plantas superiores a nível de estrutura, sequência e conteúdo gênico, os DNAct destas duas espécies podem ser tomados como representantes do grupo das Angiospermas.

As sementes foram colocadas para germinar em vermiculita estéril sob a incidência de luz, por sete dias. As plântulas foram regadas em dias alternados com água destilada esterilizada. No sétimo dia, as plântulas foram protegidas da luz, e mantidas no escuro por dois dias, para que a quantidade de carboidratos acumulados diminuísse.

Toda a extração foi feita mantendo-se sempre resfriados as soluções, vidrarias usadas e o material vegetal em extração. Para isolar-se os cloroplastos procedeu-se da seguinte maneira: cortou-se as plântulas na base, as quais foram lavadas em água fria e pesadas (usou-se aproximadamente 200 g). As plântulas foram picadas e colocadas no "Mixer" (liquidificador) contendo 700 ml de tampão A (o suficiente para cobrir os tecidos - Tris-HCl 0,05M pH8, Manitol 0.3M, EDTA tetraNa 3mM, BSA 0,1% e β-mercaptoetanol 0,028%). Homogenizou-se 3 vezes, na velocidade lenta, por 3 segundos cada vez. O

material foi filtrado em filtro de "nylon" contendo poros de 50  $\mu\text{m}$ . Centrifugou-se o filtrado a 40 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado novamente nas mesmas condições. Recuperou-se o sobrenadante e centrifugou-se a 740 x g por 10 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o precipitado em 20 ml de tampão A para cada 100 x g de material verde. Acrescentou-se 10mM de MgCl e 100  $\mu\text{g/ml}$  de DNase. A DNase agiu por 1 hora a 4°C. Após este tempo adicionou-se 3 volumes de tampão B e centrifugou-se a 1.075g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em 10 ml de tampão B (Tris 0,05M pH8.0, sacarose 0,3M, EDTA tetraNa 20mM) e centrifugado a 1.075g por 10 minutos a 4°C. Recuperou-se os cloroplastos sedimentados, os quais foram homogeneizados em 5 ml de tampão C (Tris 0,05M pH8, EDTA tetraNa 20mM) contendo 1,6 g de CsCl e 100  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K. Adicionou-se 1 ml de Sarkosyl 10% (preparado em tampão C). A mistura foi levemente agitada e deixada por 1 hora a 37°C. Após este tempo ela foi mantida em geladeira de um dia para o outro. Centrifugou-se a 1.075g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado em uma proveta contendo 8,6 g de CsCl. O sal foi dissolvido lentamente, e o volume foi completado para 12 ml com tampão C. Colocou-se 150  $\mu\text{l}$  de BET a 10 mg/ml em um tubo "Quick Seal" e adicionou-se a este tubo o lisado de cloropasto contendo o CsCl. Centrifugou-se a 140.000 x g por 40 horas a 20°C. A recuperação do DNAct, limpeza com butanol e precipitação com álcool foram feitas como descrito anteriormente para extração de DNAm<sub>t</sub>.

Após a extração o DNAct foi quantificado em espectrofotômetro, digerido e analisado em gel de agarose 0,8% quanto a sua qualidade e pureza (presença de contaminante genômico).

### 5.5. Extração de DNA total de *Marchantia chenopoda*

O DNA total desta espécie foi usado como controle positivo nas hibridizações realizadas entre as *orfs* de *M. polymorpha* e o DNAm<sub>t</sub> das plantas superiores. Optou-se pela utilização desta espécie como controle pois era necessário grandes quantidades de DNA para a confecção de membranas. Desta forma foi conveniente utilizar o DNA de uma espécie relacionada a *M. polymorpha* disponível no Brasil.

A metodologia usada foi adaptada pela Dra. Marie Catherine Boisselier (Museu de História Natural., Paris -França ) a partir da metodologia descrita por Doyle (1988) e Rogers e Bendich (1985). As plantas coletadas foram lavadas, fragmentadas com tesoura, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C.

Colocou-se 10 ml de tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 8.0, 1,4M NaCl, 2% CTAB -p/v-, 20mM EDTA tetraNa, 1% PVP -p/v-, 1% β- mercaptoetanol -v/v-) em um tubo “Corex” de 30ml e incubou-se a 65°C. Pesou-se de 0,5 a 1,0 g de material vegetal congelado, e macerou-se este material em N<sub>2</sub> líquido até a obtenção de um pó fino. Adicionou-se o macerado ao tampão de extração a 65°C, e agitou-se com uma espátula para que os aglomerados de tecido fossem desfeitos. Deixou-se sob incubação a 65°C por 30 minutos, com agitação ocasional. Dez mililitros de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram acrescentados e homogeneizados com espátula. Centrifugou-se a 5.850 x g por 15 minutos a 20°C. Recuperou-se a fase aquosa em outro “Corex” e adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol. Deixou-se de 20 a 30 minutos sob a temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 5.850 x g por 15 minutos a 20°C. Descartou-se o isopropanol e adicionou-se 10 ml de “Wash 2” (76% Etanol, 10mM NH<sub>4</sub>OAc) para a lavagem do

sedimento; manteve-se por 20 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 5.850 x g por 10 minutos a 20°C. Descartou-se o “Wash 2” cuidadosamente, e ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de TE contendo 250 µg de RNase. A RNase agiu por 2 horas a temperatura ambiente. Precipitou-se o DNA adicionando-se 0,5 ml de Acetato de Amônio 7,5M e 3,75 ml de Etanol absoluto. A solução foi reservada a temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugou-se a 5.850 x g por 15 minutos a 4°C. O álcool foi descartado e o sedimento lavado com 3 ml de Etanol 70% gelado. Descartou-se o álcool 70% e ressuspendeu-se o DNA em 150-400 µl de TE. Devido às dificuldades encontradas na ressuspensão do DNA, adicionou-se 750 µl de TE total em duas etapas, centrifugou-se, salvou-se o sobrenadante e descartou-se o precipitado que se formou.

Assim como para o DNAm<sub>t</sub> e o DNAct, o DNA total da briófitas foi quantificado em espectrofotômetro, digerido, e teve seus fragmentos separados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, para verificação de sua integridade.

### **5.6. Extração de RNAm<sub>t</sub>**

A metodologia empregada foi bastante semelhante àquela utilizada para extração de DNAm<sub>t</sub>. Sementes de coix e milho foram plantadas em vermiculita esterilizada e mantidas protegidas da luz para germinação.

Aproximadamente 150 g - 200 g de material vegetal picado foram colocados em um liquidificador contendo 3 a 4 volumes de Tampão W (Manitol 0,33M, Tris-HCl 0,05M pH 8,0, KCl 0,3M, Acetato de Magnésio 0,01M, EDTA 0,005M, 1g/l de Soroalbumina Bovina, β-Mercaptoetanol 1mM ). As soluções e materiais empregados no experimento

foram resfriados (próximo a zero grau), a fim de impedir a oxidação e o rompimento das mitocôndrias. O material foi triturado em liquidificador e a solução obtida foi filtrada em membrana “Blutex” sendo, então, centrifugada a 1.460 x g por 10 minutos a 4°C. Recuperou-se o sobrenadante e centrifugou-se a 10.400 x g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi recuperado e ressuscitado em 10 ml de Tampão W sendo, logo após, centrifugado a 16.200 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as mitocôndrias foram ressuscitadas em 4 ml de Tampão W.

A solução obtida foi homogeneizada em um “Potter”, sendo, em seguida, colocada sobre um gradiente de sacarose (60%, 52% e 30%) feito com Tampão W (sem BSA e  $\beta$ -Mercaptoetanol). O gradiente foi centrifugado a 110.000 x g por 1 hora a 4°C. Com a centrifugação ocorreu a separação das mitocôndrias do restante dos componentes celulares tais como núcleos, cloroplastos e restos de membranas. As mitocôndrias foram recuperadas e a elas foram adicionados 3 volumes de Tampão W (sem BSA e  $\beta$ -Mercaptoetanol). Centrifugou-se esta solução a 5.800 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e obteve-se um sedimento que correspondeu às mitocôndrias purificadas.

Na segunda etapa do procedimento ocorreu a extração dos ácidos nucléicos totais. A partir daqui, todo cuidado foi tomado para que não ocorressem contaminações com RNases. Os tubos e vidrarias foram limpos com água oxigenada 30 vol. diluída (1:10) em água autoclavada, e as soluções foram preparadas e usadas exclusivamente para extração de RNA. Além disto, todo o processo foi executado utilizando-se luvas. As mitocôndrias foram ressuscitadas em 4 ml de Tampão TNT (Tri-iso-propilnaftaleno-sulfonato de Sódio 2% -p/v-, NaCl 0,01M, Tris-HCl 0,05M pH 8.0). Quando necessário, as extrações foram feitas com uma substância protetora de RNA, chamada Ácido Auriltricarboxílico (ATA). O

ATA foi adicionado, juntamente com o tampão TNT, na concentração final de 1mM (estoque a 100mM ATA, Tris-HCl 0,05M pH 8.0). O tampão TNT tem a função de romper as mitocôndrias, fazendo-as liberar seu conteúdo. Adicionou-se, então, ½ volume de fenol saturado pH 8.0 e mais ½ volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Centrifugou-se por 15 minutos a 5800 x g a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente recuperada e transferida para um outro tubo. Adicionou-se novamente 4 ml do Tampão TNT contendo 1mM de ATA à fase fenólica, e centrifugou-se a 5800 x g por 15 minutos. Recuperou-se a fase aquosa e adicionou-se esta à primeira fase aquosa recuperada. Fez-se novas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) até que a interface protéica desaparecesse. Assim, a fase aquosa “limpa” foi precipitada com 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3M, pH 5.3 e 2 volumes de Etanol absoluto gelado. A solução ficou por uma noite a -20°C. Centrifugou-se a 5.800 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco a temperatura ambiente. Tal sedimento corresponde ao RNAm<sub>t</sub> e DNAm<sub>t</sub>. Ressuspendeu-se o sedimento em 4 ml de TE e, novamente, precipitou-se o mesmo com sal e álcool por 1 hora a -20°C, com o intuito de eliminar qualquer traço de fenol. Centrifugou-se a 5800 x g por 15 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento a temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de TE contendo 50µM de ATA.

Quantificou-se o RNA total obtido utilizando o aparelho “GeneQuant” (Pharmacia). Quando o RNA medido continha ATA, o “branco” empregado para a leitura da concentração foi TE adicionado de ATA 0,5µM, dado que esta substância absorve no comprimento de onda de 260nm.

Após a quantificação, 10 µg do RNA total obtido migrou por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TAE para verificar a qualidade do mesmo. Os materiais empregados foram previamente tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vol. diluída (1:10) em água autoclavada, para evitar a presença de RNases. Ao restante da solução de ácidos nucleicos adicionou-se sal e álcool e armazenou-se a mesma, aliqüotada em tubos contendo 100-200 µg de RNA, a -20°C.

#### **5.6.1. Tratamento do RNAm<sub>t</sub> com DNase livre de Rnase**

Para eliminação do DNAm<sub>t</sub>, o qual foi extraído juntamente com o RNA, empregou-se o seguinte procedimento: os ácidos nucleicos utilizados foram centrifugados por 5 minutos a 8.000 x g a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 300 µl de Etanol 70%. Centrifugou-se brevemente e descartou-se novamente o sobrenadante, deixando-se que o precipitado secasse a 37°C. Este foi, então, ressuspendido em 50 µl de TE estéril.

Elevou-se o volume para 100 µl, adicionando-se água Milli-Q estéril. Acrescentou-se os demais componentes da reação: MgCl<sub>2</sub> 10mM, 1.000 U de desoxiribonuclease I (livre de RNase) e 20 U de RNasina (inibidor de RNase). A reação se processou a 25°C por 30 minutos e, após este tempo, fez-se uma extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Procedeu-se com a precipitação utilizando-se Acetado de Sódio 3M pH 5.2 e álcool absoluto. Após secagem, o precipitado foi ressuspendido em 50 µl de TE estéril.

Após o tratamento, submeteu-se 10 µg de RNA à migração em gel de agarose 1% (preparado em tampão TAE) através de eletroforese, para certificar-se de que todo o DNA havia sido eliminado da solução.

### **5.7. Quantificação do DNA**

As concentrações do DNAm<sub>t</sub>, DNAct e DNA total da *M. chenopoda* obtidas por leituras da D.O em dois comprimentos de onda (260 e 280 nm) realizadas no espectrofotômetro, foram confirmadas através de eletroforese em gel de agarose. Para tal propósito comparou-se a intensidade das bandas destes DNA (coradas com BET e visualizadas sob UV) com a intensidade das bandas de DNA de fago λ, contendo quantidades conhecidas desta molécula.

### **5.8. Reações de PCR**

#### **5.8.1. Amplificação de DNA**

As reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram efetuadas em um aparelho termociclador Perkin-Elmer modelo 480.

As reações de amplificação das *orfs* (a partir o DNA total de *M. polymorpha*) e de insertos ligados a plasmídeos continham 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão de reação a 1X (Gibco BRL, Pharmacia), 100µM de cada dNTP, 2,5 pmoles (para 25 µl de volume final de reação) ou 10 pmoles (para 100 µl de volume final de reação) de cada oligonucleotídeo, 2,5

unidades da enzima *Taq* polimerase e 5-10 ng de DNA total de *M. polymorpha*, DNA plasmidial preparado por miniextração. Os ciclos de amplificação foram padronizados pelo Lab. de Análise Genética e Molecular (CBMEG-Unicamp), sendo:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C por 3 minutos;
- 30 ciclos de: \*desnaturação a 92°C por 1 minuto;
  - \*anelamento por 1 minuto e 30 segundos. A temperatura variou em função da T<sub>m</sub> calculada para os oligonucleotídeos (ver **Tabela 1**).
  - \*extensão a 72°C por 2 minutos;
- extensão final a 72°C por 7 minutos.

O teste dos oligonucleotídeos empregados na síntese e amplificação do cDNA de coix contendo o “cluster” *nad3-rps12*, foi feito utilizando-se 5 ng de DNAm<sub>t</sub>, as mesmas quantidades de reagentes e os mesmos ciclos descritos acima. As reações que utilizaram a combinação de oligonucleotídeos dnad3/frps12 e fnad3/frps12, uma vez que não estavam gerando amplificação específica, foram testadas com 10% de glicerol e 1,25%, 2,5% e 5,5% de formamida. Estas substâncias foram utilizadas na tentativa de facilitar o anelamento específico dos oligonucleotídeos à fita molde.

Realizou-se a amplificação de culturas de bactérias transformadas e mantidas em glicerol utilizando-se algumas particularidades. As reações continham tampão 1X (Gibco BRL), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 μM de cada dNTP, 2,5 pmol de cada oligonucleotídeo (CV72 e CV76, **Tabela 1D**), 0,5 U de enzima, água para completar 25 μl e 1-2 μl da cultura mantida em glicerol. A reação de amplificação se processou com os seguintes ciclos:

- desnaturação inicial do DNA a 94°C por 2 minutos e 30 segundos;
- 30 ciclos de: \*desnaturação a 94°C por 1 minuto;

\*anelamento a 55°C por 2 minutos;

\*extensão a 72°C por 3 minutos;

- extensão final a 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação, uma alíquota de 5-10 µl do produto amplificado foi adicionado a 2 µl de tampão "stop" tipo III concentrado 10X (0,25% "Bromophenol Blue", 30% glicerol em TE pH 8.0), e água destilada para obtenção de um volume final de 20 µl. Este volume total foi submetido a eletroforese a 80V em gel de agarose 1%, feito em tampão TAE, por 1 hora. Paralelamente às amostras, migrou-se um marcador de peso molecular (1 kb "Ladder" da Gibco-BRL, ou o DNA de fago λ digerido com *Hind III* e misturado ao DNA do fago φx174 digerido com *Hae III*), para a verificação do tamanho do fragmento amplificado.

### 5.8.2. Amplificação de cDNAs

As reações de PCR foram feitas empregando-se técnica de "Hot Start" quando o intuito era de amplificar a região 5' do cDNA com cauda poli-A, e sem "Hot Start" para amplificar o "cluster" *nad3-rps12* a partir do cDNA sem cauda, utilizando-se dois oligonucleotídeos gene-específicos. Na técnica "Hot Start" a enzima é adicionada à reação após a desnaturação do DNA e imediatamente antes do início dos ciclos de amplificação, para evitar que oligonucleotídeos anelados ao molde, em baixas temperaturas, amplifiquem sequências inespecíficas. Este passo é importante pois a temperatura de anelamento nos ciclos é 50 °C, em função do uso dos oligonucleotídeos poli-T.

### 5.8.2.1. Amplificação sem "Hot Start"

A reação de PCR continha 10  $\mu$ l de cDNA, 2,5 ou 10 pmoles (dependendo do volume final da reação- 25 ou 100  $\mu$ l, respectivamente) de cada oligonucleotídeo gene específico, 2,5mM de MgCl, tampão PCR a 1X, 150 $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* polimerase (Gibco BRL ou Boehringer) e água para completar o volume necessário. Os ciclos se caracterizaram por

- desnaturação inicial do DNA a 94°C por 6 minutos e 30 segundos;
- 25 ciclos de: \*desnaturação a 94°C por 1 minuto;
  - \*anelamento a 61°C por 1 minuto e 30 segundos;
  - \*extensão a 72°C por 2 minutos;
- extensão final a 72°C por 10 minutos.

Utilizou-se 20  $\mu$ l da amplificação para verificação em gel de agarose 1%.

### 5.8.2.2. Amplificação com "Hot Start"

Esta amplificação utilizou os oligonucleotídeos 1 e 2, ambos com três sítios para corte de enzimas de restrição e uma cauda poli-T, com dois resíduos de T no oligonucleotídeo 1 e com 16 resíduos de T no oligonucleotídeo 2 (ver **Tabela 1C**). O oligonucleotídeo 1 (com cauda poli-T longa) foi adicionado em quantidade 9 vezes menor que o oligonucleotídeo 2 (com cauda poli-T menor), para que se ligasse à cauda poli-A mais facilmente, e introduzisse, nas cadeias amplificadas, os sítios de restrição presentes em sua sequência. Uma vez inserido estes sítios de restrição, o outro oligonucleotídeo, que estava presente em uma quantidade bem maior e possui uma cauda menor, teve seu

anelamento facilitado e pôde levar a formação de cadeias com cauda poli-A mais curtas. Caudas poli-A curtas são importantes para facilitar a leitura dos resultados de sequenciamento.

A reação continha 10 µl de cDNA, 0,1 pmol/µl de um dos oligonucleotídeo gene específico (drps12), 0,01 pmol/µl do oligonucleotídeo 1, 0,09 pmol/µl de oligonucleotídeo 2, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão PCR 1X, 150mM de cada dNTP e água para completar o volume necessário.

Os ciclos se caracterizaram por

- desnaturação inicial do DNA a 94°C por 6 minutos e 30 segundos;
- tempo para aplicação da enzima *Taq*, (2,5 U da enzima da Gibco BRL ou da Boehringer): 72°C por 5 minutos;
- 25 ciclos de: \*desnaturação a 94°C por 1 minuto;  
\*anelamento a 50°C por 1 minuto e 30 segundos;  
\*extensão a 72°C por 2 minutos;
- extensão final a 72°C por 10 minutos.

Utilizou-se 20 µl da amplificação para verificação em gel de agarose 1%.

### **5.9. Purificação do DNA após eletroforese**

Os fragmentos amplificados, ou originados da digestão de DNAm<sub>t</sub> ou plasmidial, foram purificados antes de sua utilização. Para tanto, fez-se inicialmente eletroforese em gel de agarose, para separação do fragmento. O DNA foi isolado da agarose, empregando-se um dos três métodos descritos a seguir.

### 5.9.1. Centrifugação

Adicionou-se, a 25 µl do produto de amplificação, 3 µl de tampão "stop". Esta mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, paralelo a um marcador de peso molecular. O gel foi corado por 20 minutos em uma solução de BET (0,5 µg/ml). O fragmento de DNA visualizado através de luz ultra violeta, foi recortado em bloco do gel, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova, em dimensões suficientes para que toda a banda de DNA fosse extraída, mas com o mínimo de agarose possível. O bloco de agarose foi colocado em um tubo "Eppendorf" de 1,5 ml com um pequeno furo na base, coberto com lã de vidro. Este tubo "Eppendorf" foi encaixado em um segundo tubo "Eppendorf" de 1,5 ml. Os dois tubos foram mantidos a -20°C por aproximadamente 20 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 6.000 rpm (centrífuga MicroMax-IEM). Um líquido, constituído de tampão TAE e do DNA, passou através da lã de vidro e ficou retido no tubo "Eppendorf" inferior. A este líquido adicionou-se 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3M pH 5.2, 2 volumes de Etanol absoluto gelado, e manteve-se a mistura a -20° C por 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos a 11.700 x g. Descartou-se o Etanol. Adicionou-se 300 µl de Etanol 70% gelado, inverteu-se cuidadosamente o tubo e centrifugou-se a 11.700 x g por 5 minutos. Descartou-se o álcool e ressuspendeu-se o DNA precipitado em 20 µl de TE.

Após a purificação, os fragmentos de DNA foram quantificados através de comparação com um DNA padrão de peso molecular e concentração conhecidos. Dependendo do rendimento da purificação, diluiu-se 2 µl do fragmento amplificado em 8 µl de água, e 2 µl desta diluição, adicionados de solução "stop" e água, ou 1 µl do produto

não diluído, adicionado de água e tampão "stop", foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

### 5.9.2. Eletroeluição

Os fragmentos de DNA que foram clonados passaram, antes, por uma purificação. Empregou-se o método da eletroeluição, o qual produziu DNA de maior pureza e elevado rendimento após purificação.

Primeiramente, efetuou-se uma eletroforese em gel de agarose para a separação da banda de DNA contendo o fragmento de interesse. Os géis foram corados por 20 minutos em uma solução de BET (0,5 µg/ml) e descorados, em água destilada, por 10 minutos. A banda foi retirada do gel conforme explicado no item 5.9.1. Os blocos de agarose foram mantidos protegidos da luz direta, visto que eles continham BEt, o qual degrada, juntamente com o DNA, sob a ação da luz. Posteriormente, o bloco de agarose foi introduzido em um saco de diálise contendo 300 µl de tampão TBE 0,5X, sendo, em seguida, fechado nas suas extremidades com grampos plásticos. O saco de diálise fechado foi colocado em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0.5X. Procedeu-se a eletroforese por 3 horas a 100V, mantendo-se, sempre, a cuba protegida por papel alumínio para evitar a entrada de luz. Após este tempo, fez-se uma reversão da corrente elétrica por 45 segundos, para que as moléculas de DNA aderidas à parede do saco de diálise se desprendessem da mesma. Todo o conteúdo do saco foi cuidadosamente recuperado em tubo "Eppendorf" de 1,5 ml. Completou-se o volume recuperado para 300 µl com tampão TE, e adicionou-se o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1). Misturou-se

vigorosamente as fases e centrifugou-se a 8.000 x g por 2 minutos. Recuperou-se a fase aquosa e, nesta, adicionou-se a mesma quantidade de clorofórmio. Misturou-se e centrifugou-se a 8.000 x g por 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi recuperada e o DNA precipitado pela adição de 1/10 de Acetato de Sódio 3M pH 5.2 e 2 volumes de Etanol absoluto gelado. Após 20 minutos a -20 °C, centrifugou-se a 8.000 x g por 15 minutos. O DNA precipitado foi ressuspendido em 40 µl de TE.

### **5.9.3. Colunas de purificação ("kit" QIAEX II, Gel Extraction kit - Qiagen)**

Muitos dos fragmentos de DNA que foram marcados radioativamente, dos que foram subclonados, e dos que foram produzidos por amplificação passaram por uma purificação utilizando-se "kit" QIAEXII da Qiagen. Este método foi adotado devido a combinação entre maior rapidez e boa eficiência em relação aos outros métodos. O protocolo utilizado foi o proposto pelo fabricante.

## **5.10. Hibridização radioativa**

### **5.10.1. Transferência do DNA para membranas de "nylon" - "Southern blotting"**

Após digestão, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose. Uma vez separados, os fragmentos foram transferidos para membranas de "nylon" utilizadas nas hibridizações.

Utilizou-se gel de agarose 0,8% e tampão TAE 1X. As amostras de DNA e os marcadores de peso molecular  $\phi\lambda$ /(*Hae III*)- $\lambda$ /(*Hind III*) no gel foram aplicadas no gel e submetidas à migração em corrente de 20V por aproximadamente 18h. Em seguida o gel foi corado em banho com Brometo de Etídio -BET- (0,5  $\mu$ g/ml) por 20 minutos. Fotografou-se o gel em câmera "Polaroid", com iluminação ultravioleta. O gel foi fotografado com uma régua fluorescente ao lado, para poder-se calcular o tamanho dos fragmentos reconhecidos pela sonda após as hibridizações.

O DNA presente no gel foi transferido para uma membrana de "nylon" (Hybond-N+ da Amershan). Inicialmente, tratou-se o gel com uma solução de depuração (0,25M HCl) por 10 minutos, a temperatura ambiente, sob leve agitação. Lavou-se o gel em água destilada e, em seguida, ele foi transferido para uma solução de desnaturação (0,5N NaOH, 1,5M NaCl) por 15 minutos. Lavou-se o gel brevemente com água destilada e repetiu-se este passo. Após a segunda desnaturação, o gel foi lavado em água destilada e foi neutralizado em uma solução de neutralização (NaCl 1,5M; Tris-HCl 1M pH 7.4) por 15 minutos. Repetiu-se este passo duas vezes. A transferência foi feita em solução SSC 10X (NaCl 1,5M, Citrato de Sódio 0,15M). Uma plataforma foi colocada sobre um reservatório preenchido até a metade com a solução de transferência. Sobre a plataforma foram depositadas 3 folhas de papel "Whatman 3MM" cortadas pouco mais largas que o gel, e longas o suficiente para que as extremidades do papel entrassem em contato com a solução de transferência. O gel foi invertido e posicionado sobre estes papéis, e sobre ele foi depositada a membrana de "nylon" (Hybond-N), a qual possuía dimensões pouco maiores que as do gel. Sobre a membrana foram colocadas outras três folhas de papel "Whatman 3MM" do mesmo tamanho da membrana, e sobre estas depositou-se uma pilha de papel de

germinação de aproximadamente 7 cm de altura, contendo as mesmas dimensões da membrana. Sobre a pilha de papel foi colocado um peso de aproximadamente 250-350 g. A passagem do tampão pelo gel, por capilaridade, e transferência do DNA prosseguiu por 18 a 20h. Após este período, o sistema foi desmontado, a membrana foi retirada, lavada em 2X SSC para a eliminação de vestígios de agarose e seca a temperatura ambiente. O DNA foi fixado na membrana por secagem da mesma a 80°C por 2h. A membrana foi guardada a temperatura ambiente, em um envelope feito com papel absorvente.

#### **5.10.2. Transferência do RNA para membranas de "nylon" - "Northern Blotting"**

Os géis de RNAm<sub>t</sub> foram preparados com tampão MOPS 1X e formaldeído, ou seja, a migração ocorreu em condições denaturantes para evitar a formação de estruturas secundárias e ligação entre as moléculas de RNA.

Para a preparação de um gel de 300 ml, 3 g de agarose foram dissolvidas em 250 ml de água estéril. À parte, aqueceu-se a 55°C 17,5 ml de formaldeído adicionado de 30 ml de tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanesulfônico] 10X (20,6 g/l do ácido, EDTA 0,005M pH 8.0). Após a dissolução da agarose, resfriou-se a solução a 55°C e adicionou-se a ela a mistura de MOPS e formaldeído. Verteu-se a mistura em um suporte de acrílico para a solidificação do gel.

As amostras de RNAm<sub>t</sub> de coix, milho, couve flor e batata foram preparados da seguinte forma: em cada tubo "Eppendorf" de 1,5 ml adicionou-se 10 µg (no caso de coix, milho, couve flor) ou 20 µg (no caso de batata) de RNA total tratado com DNase, 5,5 µl de

formaldeído, 15 µl de formamida, 1,5 µl de MOPS 10X e água Milli-Q para completar o volume final de 30 µl. A formamida e o formaldeído, como já mencionado, são substâncias denaturantes que mantêm o RNA nas condições adequadas para a migração. Aqueceu-se as amostras a 55°C por 15 minutos e, em seguida, transferiu-se as mesmas para o gelo por 5 minutos. Adicionou-se 3 µl de tampão "stop" 10X ("bromophenol blue" 0,25%, EDTA 0,25M pH 8.0, glicerol 50%).

O marcador de peso molecular utilizado foi o 0,24-9,5 kb "Ladder" de RNA (Gibco BRL) a 1 µg/µl (utilizou-se 9 µg de marcador). O marcador foi preparado da mesma maneira que as amostras de RNA, com a diferença de que, após a colocação do "stop" 10X, adicionou-se 3 µg de Brometo de Etídeo.

As amostras e o marcador foram aplicados no gel e efetuou-se a eletroforese por 5 horas a 80V. Após a eletroforese, a coluna contendo o marcador foi isolada do restante do gel. Esta coluna foi descorada em água pura até que as bandas adquirissem uma coloração adequada para serem fotografadas. Fotografou-se a coluna de gel contendo as bandas do marcador com uma régua fluorescente ao lado, para que fosse possível conhecer a relação distância migrada e o tamanho em pb das bandas de RNA.

O restante do gel foi submetido a 2 lavagens iniciais, de 15 minutos cada, com água destilada estéril, e, em seguida, passou por 2 outras lavagens com SSC 10X de 15 minutos cada. Após isto, montou-se um sistema de transferência por capilaridade, do mesmo modo que para a transferência de DNA. Todo o material e soluções empregados foram tratados para estarem livres de RNases. A transferência se processou por 16 horas e a membrana obtida foi queimada a 80°C por 2 horas para fixação das moléculas à membrana.

Para testar a qualidade do RNAm<sub>t</sub> presente nas membranas as mesmas foram hibridizadas com o gene mitocondrial de *Oenothera berteriana* que codifica a subunidade  $\alpha$  do complexo ATPase, o qual é bastante conservado entre as espécies de plantas superiores (Braun e Levings III, 1985; Schuster e Brennicke, 1986). Os transcritos deste gene são abundantes, dado a importância do complexo ATPase para a geração de energia durante a fosforilação oxidativa. Desta forma, este transcrito é facilmente detectado em hibridizações e, dependendo da aparência do sinal detectado na autoradiografia da banda que se hibridiza ao gene marcado radioativamente, pode-se inferir sobre a integridade das moléculas de RNA presentes na membrana: se o sinal apresenta-se difuso, como um "smear", é indicativo de que as moléculas estão bem degradadas e membrana pode não ser adequada para a detecção do RNA que se procura; porém se o sinal se apresentar uniforme e intenso deduz-se que os RNAs estão íntegros e a membrana está adequada.

Para obter-se este gene, amplificou-se o inserto que o continha e que estava clonado em pGEM7+, utilizando-se os oligonucleotídeos CV72 e CV76 (vide **Tabela 1D**). A reação de PCR está descrita no item **5.8.1**. O fragmento foi digerido para retirar pedaços de "polylinker" de suas extremidades. Após isto, migrou-se o mesmo através de eletroforese em gel de agarose 1%, isolou-se o fragmento do gel e o purificou-se (item **5.9.3**).

### **5.10.3. Marcação radioativa das sondas (Kit Prime-a-Gene/ Promega)**

O protocolo utilizado na marcação das sondas foi baseado no método do "Random-Priming" descrito por Feinberg e Volgstein (1983), empregando-se a

incorporação de nucleotídeos marcados radioativamente nos fragmentos de DNA. Foi utilizado o "kit" de marcação "Prime-a-Gene" da Promega, seguindo-se as especificações do fabricante. A reação de "Random-Priming" consiste na polimerização do DNA por ação do fragmento "Klenow" da DNA polimerase I a partir de oligonucleotídeos (hexâmeros) aleatórios. A reação se processou num volume final de 50  $\mu$ l da seguinte forma: adicionou-se em um tubo "Eppendorf" de 1,5 ml 25 ng de DNA e H<sub>2</sub>O suficiente para completar 30  $\mu$ l. Esta mistura foi então aquecida a 100°C por 5 minutos para a desnaturação do DNA. Após a desnaturação foram adicionados 10  $\mu$ l de tampão de reação fornecido pelo "kit", 2  $\mu$ l de uma mistura de dNTPs não marcados, contendo 2  $\mu$ l de cada dNTP a 1,5mM, 2  $\mu$ l de BSA (1 mg/ml), 1  $\mu$ l (5 unidades) da enzima e 5  $\mu$ l do dNTP marcado radioativamente ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P[dATP] ou  $\alpha$ -<sup>32</sup>P[dCTP]). A reação foi mantida de 2 a 4 horas a temperatura ambiente.

Em função da conhecida riqueza do DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha* em adeninas, utilizou-se o deoxinucleotídeo dATP marcado radioativamente para marcação dos fragmentos do DNAm<sub>t</sub> da briófito. Quando o fragmento a ser marcado era oriundo do DNAm<sub>t</sub> de planta superior, o qual tem, aproximadamente, a mesma percentagem de A+T e C+G, utilizou-se tanto o dCTP quanto o dATP marcado radioativamente.

#### **5.10.4. Separação dos nucleotídeos não incorporados**

Após a reação de marcação, foram adicionados à sonda 50  $\mu$ l de STE (0,1M NaCl, 10mM Tris-HCL pH 8,0, 1mM EDTA). Em seguida purificou-se a sonda para eliminação dos nucleotídeos marcados e não incorporados, através de passagem em coluna de "Sephadex" G50 montada em STE e equilibrada com 100  $\mu$ l do mesmo tampão.

Esta coluna foi construída da seguinte forma: em uma seringa de 1 ml (sem êmbolo e agulha), compactou-se uma pequena quantidade de lã de vidro siliconizada, de forma que fosse obstruído o orifício de conexão com a agulha. Em seguida, a seringa foi preenchida com a resina "Sephadex G50" (preparada em tampão STE), sendo esta compactada através de sucessivas centrifugações. Quando o volume da resina compactada atingiu a marca de 0,7 ml, a minicoluna foi colocada em um tubo de polipropileno de 15 ml contendo, no fundo, um microtubo sem tampa. Aplicou-se, sobre a coluna, o volume da reação de marcação acrescido de 50 µl de tampão STE e centrifugou-se o conjunto por 2 minutos a 3.100 x g. Após a centrifugação, os nucleotídeos não incorporados ficaram retidos na coluna e a sonda foi recuperada no microtubo.

O volume recuperado foi desnaturado a 100°C por 5 minutos imediatamente antes do uso. Para a purificação das sondas também foi utilizado o "kit" "Qiaquick Removal" da Qiagen.

#### **5.10.5. Medida de incorporação de radioatividade**

Para as hibridizações nas membranas contendo RNA, realizou-se medidas da taxa de incorporação de nucleotídeos marcados em um contador de cintilação líquida. Fez-se isto para se ter um parâmetro na decisão sobre o tempo de exposição das autoradiografias.

Em dois pedaços de papel DE81 (1 cm<sup>2</sup>) colocou-se 1 µl da reação de marcação antes e depois de passar na coluna. Após secarem, os papéis foram colocados separadamente em frascos de vidro no suporte apropriado do cintilador. Efetuou-se a leitura em Cherenkov (leitura de P<sup>32</sup> no canal de tritium). A amostra que não passou pela coluna

indicou a radioatividade total na reação e a amostra que passou pela coluna, indicou a radioatividade incorporada na sonda. A sonda marcada foi utilizada quando apresentou um mínimo de 50% de incorporação de radioatividade.

#### **5.10.6. Hibridização do DNA**

As hibridizações foram realizadas segundo dois protocolos básicos, diferenciados pela estringência das condições empregadas. Esta estringência se definiu basicamente pela presença ou não de formamida na solução de pré hibridização e hibridização, e pela concentração de sal nas soluções de lavagem. A presença de formamida e uma menor concentração de sal nas soluções de lavagens determinam uma maior estringência, isto é, maior possibilidade de hibridização entre fragmentos com maior similaridade de sequência. Assim, conforme a combinação entre a origem da sonda e do DNA presente nas membranas onde foram feitas as hibridizações, e em função do propósito da hibridização, optou-se por um protocolo “mais” ou “menos estringente”.

##### **5.10.6.1. Hibridização em baixa estringência**

Hibridizações nestas condições foram utilizadas quando as sondas empregadas eram as *orfs* de *M. polymorpha* e as membranas continham o DNAmT das Angiospermas. As condições empregadas permitiram hibridização entre sequências com aproximadamente 50% de similaridade. A pré hibridização foi feita a 45°C por 4-24 horas, em meio contendo 5X SSC (750mM NaCl, 75mM Citrato de Sódio), 10X Denhardt's (1% Ficoll, 1% PVP, 1% BSA-p/v), 0,1% de SDS, 20mM de Tris HCl pH 7.5, 100 µg/ml de DNA de esperma de

salmão desnaturado e água. Após este tempo, metade desta solução foi descartada e à metade restante adicionou-se a sonda desnaturada e purificada. A hibridização prosseguiu por 16 horas a 45°C. Em seguida, a membrana foi lavada brevemente com 1X SSC / 0,1% SDS a temperatura ambiente, e, por duas vezes, 15 minutos cada, nesta mesma solução a 45°C (para a *orf99*, *orf180* e *orf86a*), a 50°C (na hibridização da *orf136* e *orf167*) e a 48 °C (na hibridização da *orf207*). Estas temperaturas de lavagens foram as que, entre as testadas, apresentaram o melhor resultado para a *orf* em questão.

Após as lavagens, as membranas foram acondicionadas em sacos plásticos e expostas a filmes autoradiográficos dentro de cassetes com intensificador de sinal, a -70°C e pelo tempo adequado. Após a exposição, as autoradiografias foram reveladas, e as membranas tiveram as sondas removidas sua posterior reutilização. Para remoção das sondas lavou-se as membranas em uma solução de NaOH 0,4N a 45°C por 30 minutos, sob fraca agitação. Em seguida as membranas foram lavadas por 15 minutos a 45°C, em 0,1X SSC, 0,1% SDS, 0,2M Tris-HCl pH 7.5. As membranas foram armazenadas a -20°C em sacos plásticos hermeticamente fechados.

#### **5.10.6.2. Hibridização do DNA em alta estringência**

Sabe-se que existe, de uma espécie de angiosperma para outra, uma alta conservação das sequências primárias entre os mesmos genes mitocondriais. Esta similaridade permite que hibridizações, entre genes mitocondriais de plantas superiores (fixados em membrana) e sondas sintetizadas de genes mitocondriais de plantas superiores, sejam efetuadas em alta estringência. Assim, as condições de hibridização foram as mesmas

de uma hibridização homóloga, ou seja, em alta estringência. Estas condições também foram empregadas, quando tanto a sonda quanto o DNAm<sub>t</sub> aderido à membrana eram *orfs* amplificadas de *M. polymorpha*.

As hibridizações em alta estringência foram realizadas nas seguintes condições: pré-hibridização por 4-24 horas em meio contendo 5X SSC, 10X Denhardt's, 20mM de Tris-HCL pH 7.5, 1% SDS, 50% de Formamida e 100 µg/ml de esperma de salmão desnaturado, a 42°C. Metade desta solução foi descartada e, à metade restante, adicionou-se a sonda desnaturada. A hibridização ocorreu por 16 horas a 42°C. Após a hibridização, a membrana foi lavada 2 vezes, por 10 minutos, em 2X SSC / 1% SDS, a temperatura ambiente, e depois por mais 2 vezes, 10 minutos cada, em 0,1% SSC / 0,1% SDS, a 42°C.

Após a hibridização, as membranas foram colocadas em contato com filmes autoradiográficos. Nas hibridizações em alta estringência, por serem os DNAs envolvidos altamente similares, as sondas se ligam mais fortemente ao DNA, e, assim, as membranas necessitam de menor tempo de exposição para gerarem bons sinais na autoradiografia.

#### **5.10.7 Hibridização do RNA**

A reação de hibridização foi feita em alta estringência, cujas condições estão descritas no item **5.10.6.1**, dado que estas hibridizações ocorreram sempre entre genes mitocondriais e RNAm<sub>t</sub> de plantas superiores.

Uma variável, em relação ao descrito nos itens acima, foi o tempo de exposição das autoradiografias, que chegou a ser de mais de dez dias dependendo da força do sinal emitido pela radioatividade. Se o RNA que se hibridizou a sonda estava pouco

representado, pouca sonda se ligou a este RNA e vários dias foram necessários para se detectar o sinal emitido pela radioatividade. As membranas contendo RNA não tiveram as sondas removidas para posterior utilização, pois observou-se que o processo de remoção das sondas removeu todo o RNA aderido à ela. Assim, para cada hibridização foi necessário utilizar uma nova membrana.

### **5.11. Clonagem de insertos em plasmídeos**

Todos os fragmentos analisados neste trabalho foram clonados em vetor pBluescript KS<sup>+</sup> (Stratagene) ou pGEM-T (Promega).

Os fragmentos clonados foram inicialmente obtidos por digestão ou amplificação por PCR de DNAm<sub>t</sub> ou cDNA, separados por eletroforese em gel de agarose 1%, isolados do gel, purificados e precipitados conforme descrito no item 5.9.

A ligação inserto-vetor foi efetuada utilizando-se 1-2 U da enzima T4 DNA ligase (Gibco BRL), quando o inserto possuía extremidades coesivas, ou 7,5-15 U de T4 DNA ligase (Pharmacia) quando o mesmo possuía extremidades abruptas.

Cerca de 100 ng do plasmídeo pBluescript KSII+ [previamente aberto com a(s) enzima(s) adequada(s)] foram adicionados ao inserto, e ambos foram precipitados juntos e depois sedimentados por centrifugação a 8.000 x g por 15 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em 14 µl de tampão de ligação 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 1mM DTT, 5% PEG). Adicionou-se à este volume 1-2 U da enzima T4 DNA ligase. A reação foi realizada a 16°C por 16 horas.

Quando necessário, o inserto teve suas extremidades preenchidas para que ficassem abruptas ("blunt"), possibilitando, assim, sua ligação ao plasmídeo digerido com *Sma I*. A reação de preenchimento foi realizada da seguinte forma: o fragmento purificado foi precipitado e o sedimento foi ressuspendido em 17,5 µl de água. Acrescentou-se tampão "react 2" da Gibco BRL para concentração final de 1X (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl) em 25 µl de reação, 0,08mM dNTP e 1 U de enzima "Klenow fragment" (Gibco BRL). A reação foi incubada por 20 minutos a 37°C. Após isto misturou-se a ela 100 ng do plasmídeo digerido com *Sma I* e o volume necessário de água para completar 300 µl. Adicionou-se fenol:clorofórmio 1:1. Agitou-se e centrifugou-se a 8.000 x g por 2 minutos. Recuperou-se a fase aquosa e adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio. Centrifugou-se a 8.000 x g por 15 minutos e recuperou-se, novamente, a fase aquosa. Precipitou-se o DNA (fragmento a ser clonado mais plasmídeo digerido) como já descrito. Para execução da reação de ligação, o sedimento de DNA foi ressuspendido em 10 µl de água, tampão de ligação 1X (10mM Tris-acetato, 10mM Acetato de Magnésio, 50mM Acetato de Potássio), 7,5-15 U de T4 DNAligase e 1 mM ATP. A reação foi mantida em banho maria a 16 °C por 16 horas.

Para a clonagem de fragmentos amplificados por PCR utilizou-se o "kit" "pGEM-T vector System I" (Promega) conforme instruções do fabricante.

### **5.12. Obtenção de células competentes**

O protocolo a seguir foi adaptado de Sambrook et al (1989) por Avi Levy (comunicação pessoal).

Cresceu-se uma única colônia de *E. coli*, linhagem DHR $\alpha$ , em 5 ml de LB (1% triptose, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl -p/v) sem antibiótico, durante a noite à 37 °C. Cem microlitos desta cultura foram colocados em 10 ml de meio TYM (2% triptona -p/v-, 0,5% extrato de levedura -p/v-, 0,58% NaCl -p/v-, 0,25% Mg SO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O -p/v) e incubados a 37 °C até obter-se DO 600 = 0,2-0,6. Os 10 ml de meio com as bactérias foram adicionados a 40 ml de TYM e, novamente, colocou-se a 37 °C para crescimento das bactérias até DO 600 = 0,5-0,9. Em seguida nestes 50 ml foram acrescentados 200 ml de TYM, e incubou-se a cultura a 37 °C até obter-se DO 600 = 0,6. A cultura foi rapidamente colocado em gelo. O volume total foi vertido em dois frascos, previamente resfriados, de 250 ml. Centrifugou-se a 3.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 100 ml de TBF1 gelado (0,03M KOAC, 0,05M MnCl<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O, 0,1M KCl, 0,01M CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 0,01M KCl, 15% glicerol -p/v). Centrifugou-se novamente a 3000 x g por 8 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 10 ml de TBF2 (0,01M MOPS, 0,075M CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 0,01M KCl, 15% glicerol -p/v). A solução contendo as bactérias competentes foram alíquotadas em tubos "eppendorfs" previamente resfriados (100  $\mu$ l por tubo), os quais foram armazenados a -80 °C.

### 5.13. Transformação de bactérias

A reação de ligação inserto-vetor foi diluída 5X em tampão de transformação 1X (100mM KCl, 30mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM MgCl<sub>2</sub>, PEG 1,5 %) e utilizada para transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, preparadas pelo método descrito no item acima. Alíquotas de 5  $\mu$ l, até todo o volume da reação de ligação, diluídas em tampão foram

---

utilizadas na transformação de 100  $\mu$ l de bactérias competentes. Misturou-se a ligação diluída às bactérias e manteve-se a mistura no gelo por 15-30 minutos. Em seguida, os tubos foram retirados do gelo e mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos. Acrescentou-se 1 ml de LB sem ampicilina e colocou-se a 37 °C para que as bactérias se multiplicassem e expressassem a resistência ao antibiótico. Entre 100-150  $\mu$ l de cada cultura, mais 30  $\mu$ l de IPTG (24  $\mu$ g/ml) e 30  $\mu$ l de X-gal (2%) foram espalhadas em placas de petri contendo meio de cultura LB sólido e ampicilina (100  $\mu$ g/ml). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas para o crescimento das colônias transformadas.

As colônias contendo os plasmídeos recombinantes puderam ser reconhecidas com a utilização do ensaio IPTG / X-gal. Os plasmídeos pBluescript e pGEM-T possuem no “polylinker” uma porção do gene Lac Z (originário do operon Lac de *E. coli*) que codifica a subunidade  $\theta$  da enzima  $\beta$ -galactosidase. Quando não há interrupção desta sequência, a subunidade  $\theta$  é produzida e faz  $\alpha$ -complementação com a porção  $\alpha$  da enzima produzida pela bactéria, formando, assim, uma enzima  $\beta$ -galactosidase intacta e funcional dentro da célula. Esta enzima atua sobre o substrato fornecido pelo ensaio (X-gal), quebrando-o e originando, assim, um composto de cor azul que se acumula na colônia e é facilmente visível. Desta forma pode-se detectar as colônias contendo os clones não recombinantes. Quando há inserção de fragmento, a porção do gene lacZ presente no “polylinker” é rompida, não ocorre  $\alpha$ -complementação e quebra do substrato X-gal. Deste modo as colônias contendo os plasmídeos recombinantes podem ser detectadas pela ausência de cor azulada. O IPTG é um composto empregado para impedir a atuação do repressor deste sistema, constitutivamente expressado pela bactéria.

### **5.13.1. Preparo de estoque de bactérias transformadas em placas de microtítulo**

Preparou-se as placas de microtítulo colocando-se, em cada alvéolo, 120 µl de LB adicionado de ampicilina (100 µl/ml). Colônias brancas foram recolhidas com a ponta de um palito de madeira autoclavado e inoculadas, cada uma, em um alvéolo. As placas foram, então, colocadas na estufa a 37 °C para o crescimento das colônias, por 16 horas. Após isto, cada alvéolo recebeu 80 µl de LB + ampicilina (100µg/ml) + glicerol (50%). As placas foram estocadas a -80°C para as análises posteriores.

### **5.13.2. Preparo de estoque de bactérias transformadas em tubos de 2ml**

Uma colônia foi inoculada em 2 ml de meio líquido LB acrescido de ampicilina (100 µg/ml). Após incubação à 37°C durante a noite com agitação vigorosa, uma alíquota de 750 µl da cultura foi misturada a 250 µl de glicerol em tubo apropriado. As culturas em glicerol foram armazenadas a -70°C.

## **5.14. Extração de plasmídeos**

### **5.14.1. Lise alcalina I**

A extração baseou-se no protocolo de Sambrook et al. (1989), com algumas modificações. Um mililitro e meio de cultura de células transformadas foram centrifugados

por 1 minuto a 8.000 x g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 100 µl de Solução I (Glucose 50mM, Tris-HCl pH 8.0 25mM, EDTA pH 8.0 10mM). Em seguida, foram adicionados 200 µl da Solução II (NaOH 0,2N, SDS 1%), e misturou-se por inversão. Adicionou-se 150 µl da Solução III (Acetato de Potássio 5M; Ácido Acético 2M). A mistura foi centrifugada por 3 minutos a 8.000 x g, a temperatura ambiente. Transferiu-se 400 µl do sobrenadante para um tubo contendo 720 µl de Etanol absoluto e centrifugou-se a solução por 1 minuto a 8.000 x g. Descartou-se o álcool e lavou-se o precipitado com 600 µl de Etanol 70%. Nova centrifugação por 1 minuto a 8.000 x g foi efetuada e o precipitado liofilizado e ressuspensionado em 40 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM) contendo 10 µg de RNase. A concentração do plasmídeo foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TAE 1X, tendo-se, como parâmetros de concentrações, 100 ng do DNA do fago φX174 e do fago λ digeridos, respectivamente, por *Hae III* e *Hind III*.

#### **5.14.2. Lise alcalina II**

Para tal preparação cresceu-se uma colônia de bactéria transformada em 3 ml de LB acrescidos de ampicilina (100 µg/ml). Centrifugou-se o volume em duas etapas (com 1,5 ml cada) por 30-60 segundos a 16.000 x g. Ressuspendeu-se o sedimento em 300 µl de P1 (Tris-HCl pH 8.0 50mM, EDTA pH 8.0 10mM, Rnase 100 µg/ml). Adicionou-se 300 µl de P2 (NaOH 200mM, SDS 1%), inverteu-se suavemente e incubou-se por 5 minutos. Adicionou-se 300 µl de P3 (Acetato de Potássio 3M pH 5.5) e agitou-se por inversão suave. Centrifugou-se por 10 minutos a 16.000 x g. Coletou-se 700-800 µl do sobrenadante e a

este adicionou-se 400 µl de isopropanol. Centrifugou-se por 10 minutos a 16.000 x g. Lavou-se o precipitado com Etanol 70%. O precipitado foi ressuspenso em 40 µl de TE. Este protocolo além de ser bem mais rápido em relação aos outros, rendeu boa quantidade de DNA com pureza adequada para as reações de sequenciamento.

### 5.14.3. "Boiling"

Este método também foi empregado para as preparações de plasmídeos que foram utilizados para sequenciamento.

Para a execução deste método centrifugou-se 1,5 ml de cada pré-cultura por 45 segundos a 13.800 x g. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µl de STET (Sacarose 8%, Triton X-100 1%, EDTA 50mM pH 8.0, Tris-HCl 50mM pH 8.0), com o qual ressuspenso-se o precipitado de bactérias. Adicionou-se 40 µl de Tris-HCl 50mM pH 8.0, Lisozima 10mg/ml e incubou-se a temperatura ambiente. Em seguida aqueceu-se a mistura a 100°C por 2 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos a 8.000 x g e retirou-se o precipitado com o auxílio de um palito de madeira. Adicionou-se 640 µl de Isopropanol 75% / NH<sub>4</sub>AcO 2,5M e centrifugou-se a 13.800 x g por 10 minutos. Lavou-se o precipitado com Etanol 70% e centrifugou-se novamente por 4 minutos a 13.800 x g. O precipitado foi seco a 37°C e ressuspenso em 60 µl de TE-RNase (20 µg/ml).

Para verificação e quantificação da preparação de DNA plasmidial preparou-se um gel de agarose 0,8% onde migrou-se 1 µl - 5 µl da amostra além de 60-400 ng do marcador λ(*Hind III*). Após migração corou-se o gel com BET. A quantificação efetuou-se através da

comparação da intensidade da banda da amostra com as bandas do marcador de tamanho semelhante, para os quais sabe-se a quantidade de DNA presente.

### **5.15. Verificação dos clones recombinantes**

Após obtenção das colônias, os clones recombinantes (contidos em colônias brancas) foram repicados em LB contendo ampicilina (100 µg/ml). Após incubação por 16 horas a 37 °C, extraíu-se o DNA das colônias pelo método da lise alcalina descrita no item 5.14.1. O plasmídeo foi, então, digerido empregando-se as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem (no caso de clonagens direcionais) ou enzimas vizinhas ao sítio *Sma I* (clonagens entre extremidades abruptas). Alternativamente também empregou-se amplificação do inserto por PCR, diretamente a partir da cultura mantida em glicerol.

Para verificação do tamanho do inserto efetuou-se eletroforese em gel de agarose 0,8-1%. Quando necessário, efetuou-se a transferência do DNA para membranas e hibridizou-se as mesmas com a sonda adequada para confirmação da identidade do clone.

### **5.16. Sequenciamento**

#### **5.16.1. Preparo do DNA utilizado**

Os plasmídeos sequenciados foram, nas primeiras preparações, extraídos segundo o método de lise alcalina descrito no item 5.14.1., ou segundo o método do “Boiling” descrito

no item 5.14.3. Posteriormente estes métodos foram substituídos pelo método simplificado de lise alcalina (item 5.14.2), o qual gera bom rendimento e boa qualidade de DNA.

Para verificação e quantificação da preparação de DNA plasmidial preparou-se um gel de agarose 0,8% onde migrou-se 1 µl-5 µl da amostra além de 60-400 ng do marcador de peso molecular DNA de  $\lambda$  digerido com *Hind III*. Após migração, corou-se o gel com Brometo de Etídeo. A quantificação efetuou-se através da comparação da intensidade da banda da amostra com as bandas do marcador de tamanho semelhante e quantidade de DNA conhecida.

O produto de minipreparação foi purificado com PEG (Polietilenoglicol). Ao volume obtido na minipreparação de plasmídeos (método Lise Alcalina I ou “Boiling”) acrescentou-se água para completar o volume de 200 µl, e 200 µl de PEG 8.000 13%, NaCl 1,6M. Misturou-se bem e deixou-se a 4°C por 1 hora. Centrifugou-se por 20 minutos a 13.800 x g e adicionou-se 100 µl de água ao precipitado obtido. Precipitou-se com 1/10 do volume de NaAcO 3M pH 5.2 e 2 volumes de Etanol absoluto, deixando-se por 1 hora a -70°C. Centrifugou-se por 20 minutos a 13.800 x g e lavou-se o precipitado com Etanol 70%. Centrifugou-se por mais 9 minutos e secou-se o precipitado a vácuo. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em um volume apropriado de água, de modo a se ter uma concentração de aproximadamente 100 ng/µl. Após a purificação com PEG, fez-se nova quantificação em gel de agarose.

### 5.16.2. Reação de sequenciamento

Os plasmídeos foram sequenciados utilizando-se o sequenciador automático ABI PRISM/ Modelo 310 e 377 da Perkin Elmer do Laboratório Genoma do CBMEG (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética- Unicamp) e sequenciadores automáticos do Nucleic Acid Service Laboratory da University of British Columbia (Canadá). As reações de sequenciamento realizadas no CBMEG utilizaram o "kit" "Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-Mix" (Amersham), ou o "kit" "Big Dye Terminator" (Perkin Elmer), seguindo as instruções do fabricante.

#### 5.16.2.1. "Kit Thermo Sequenase" (Amersham)

Em uma quantidade que variou de 200 ng a 1000 ng de DNA plasmidial, foram acrescentados 10 pmoles do oligonucleotídeo apropriado (Universal ou Reverso), 8 µl de "pré-mix" (125mM Tris-HCl pH 9.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25mM dITP, 0,25mM dATP, dCTP, dTTP e ddNTP marcados com os fluorocromos específicos, Thermo Sequenase DNA polimerase, pirofosfatase inorgânica termoestável, Nonidet<sup>TM</sup> p40, Tween<sup>TM</sup> 20 e 6,25% glicerol) e água suficiente para elevar o volume da reação a 20 µl. As condições da reação de amplificação foram: desnaturação inicial de 1 minuto a 96°C; 20 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 45°C por 15 segundos, e extensão a 60 °C por 4 minutos. Após o término da reação, o DNA foi precipitado com 7,5 µl de Acetato de Amônio 7,5M e 68 µl de Etanol absoluto gelado por 20 minutos a -70 °C, e, a seguir, centrifugado a 13.800 x g por 20 minutos. O precipitado foi lavado com Etanol 70%, seco a

vácuo, mantido a -20 °C até a ressuspensão em tampão de corrida (“Formamide Loading Dye”) e aplicação no sequenciador automático.

#### **5.16.2.2. “Kit Big Dye Terminator” (Perkin Elmer)**

Para as reações com este “kit” empregou-se 1 µg de plasmídeo, 3 µl do “Mix” fornecido pelo “kit”, 2 µl do oligonucleotídeo apropriado (Universal ou Reverso) a 5 µM e água para completar o volume final de 15 µl. Os ciclos empregados na reação de amplificação foram: desnaturação inicial de 1 minutos e 30 segundos a 96°C; 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 12 segundos, anelamento a 50°C por 6 segundos, e extensão a 60°C por 4 minutos. Após a reação de extensão o DNA foi precipitado adicionando-se 80 µl de Isopropanol 75%. Após 20 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se a 13.000 x g por 30 minutos. Adicionou-se ao precipitado 250 µl de isopropanol 75% e centrifugou-se a 13.000 x g por 20 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado em 250 µl de isopropanol e centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 x g. O precipitado foi seco a vácuo e ressuspendido no tampão de corrida do “kit” (TSE).

#### **5.17. Análises da sequência de bases**

As sequências obtidas foram analisadas pelos programas Edit Seq (DNASTAR, Inc. 1989-1992), através do qual removeu-se as sequências do “polylinker” do plasmídeo, e Seqman (DNASTAR, Inc. 1989-1992), através do qual foi possível alinhar as sequências. Ambos os programas são utilizados no computador Macintosh II SI. Foram também

utilizados os programas CLUSTAL X (configurado para PC) e CLUSTAL W (configurado para Macintosh).

Através do programa Internet Explorer acessou-se a página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, na qual utilizou-se o programa BLAST para comparação de sequências. A sequência completa do fragmento estudado foi comparada com as outras sequências existentes no banco, sob a forma de sequência de nucleotídeos.

### **5.18. Síntese de cDNA**

Foram empregados oligonucleotídeos específicos para amplificação dos cDNA (drps12 e o map5').

Misturou-se 1 µg de RNAm<sup>t</sup> extraído sem ATA com 10 pmoles de oligonucleotídeo, em um volume final de 3 µl. Aqueceu-se por 10 minutos a 65°C. Em seguida, mantendo-se os tubos no gelo, adicionou-se o tampão da enzima para uma concentração final de 1X, 10mM de DTT, 1mM de cada dNTP, 20 U de RNAsina, 50 U da enzima “Expanded<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase” da Boehringer e água para completar o volume de 20 µl. Manteve-se a reação por 60 minutos a 42°C, e, após isto, inativou-se a enzima por aquecimento a 95°C por 2 minutos.

#### **5.18.1. Purificação de cDNA**

Para eliminação do oligonucleotídeo gene-específico e das pequenas cadeias de cDNA, efetuou-se a passagem da reação de síntese de cDNA por uma coluna de Sephadex,

chamada “cDNA Spun Column S-300 (Pharmacia). As colunas foram equilibradas com tampão STE (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl) conforme especificado pelo fabricante. Para purificação do cDNA, colocou-se a coluna em tubo “Corex” de 30 ml e centrifugou-se a 400 x g utilizando-se rotor do tipo “Swing” por 2 minutos. Descartou-se o STE recolhido com a centrifugação. Aplicou-se o cDNA a ser purificado bem no centro da superfície do gel da coluna. Colocou-se um tubo “Eppendorf” de 1,5 ml no fundo do tubo “Corex” de 30 ml e, em seguida, colocou-se a coluna dentro deste mesmo “Corex”, de forma que a sua extremidade inferior ficasse dentro do tubo “Eppendorf” de 1,5 ml. Centrifugou-se a 400 x g por 2 minutos. Mediu-se o volume do líquido presente no tubo “Eppendorf” e precipitou-se o mesmo com 1/10 vol de Acetato de Sódio 3M pH 5.2 e 2 volumes de Etanol.

#### **5.18.2. Síntese de cauda poli-A**

Os cDNA purificados e precipitados foram ressuspensos em 10 µl de TE, e, a este volume, adicionou-se: tampão da enzima a uma concentração final 1X, 10 U da enzima Terminal Transferase (TdT da Gibco BRL), 20 µM de dATP e água para completar 10 µl. Manteve-se a mistura a 37°C por exatos 3 minutos. Parou-se a reação colocando-se, a mesma, a 65°C por 5 minutos. Diluiu-se a mistura com TE para o volume final de 250 µl.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. 1º ETAPA: Estudo da conservação de diferentes *orfs* do DNAm<sub>t</sub> de *M.*

#### *polymorpha* no DNAm<sub>t</sub> de plantas superiores

A primeira etapa do estudo teve por objetivo verificar a conservação, no DNAm<sub>t</sub> de algumas espécies de plantas superiores, de um grupo de *orfs* descritas no DNAm<sub>t</sub> da briófito *M. polymorpha*.

#### 6.1.1. Extrações de DNAm<sub>t</sub>, DNAct e DNA total de *M. chenopoda*

##### 6.1.1.1. DNAm<sub>t</sub> e DNAct

Para a maioria das espécies a qualidade do DNA extraído foi adequada para os objetivos do trabalho. Pode-se observar a qualidade do DNA após digestão com enzimas de restrição e migração através de eletroforese dos fragmentos obtidos. Quando não há degradação, observa-se bandas bem definidas e ausência de “smear”, ou seja, rastro de DNA degradado. O DNAm<sub>t</sub> de plantas apresenta-se, após digestão, como bandas discretas, devido ao tamanho relativamente pequeno deste genoma, em comparação com um genoma nuclear.

Na **Tabela 2** são apresentados a quantidade de material vegetal utilizado para extração e o total de DNAm<sub>t</sub> obtido.

O rendimento em DNAm<sub>t</sub>, para cada espécie, é bastante diferente. Verificou-se, que couve-flor e coix foram capazes de render mais DNA que as espécies das quais utilizou-se grandes quantidades de tecido vegetal para a extração, como batata e alfafa.

Espécie	Peso Mat. Vegetal	Rendimento	
		DNAmt	DNAct
Batata	500g	76,2 µg	-
couve-flor	480g	144 µg	-
alfafa	350g	40 µg	-
coix	320g	256 µg	-
ervilha	230g	5 µg	-
soja	200g	16,5 µg	-
milho	160g	5,5 µg	-
coix	60g	-	6,25 µg

**Tabela 2.** Quantidade de material vegetal empregado para a realização das extrações, e o total, em µg, de DNAmt ou DNA de cloroplasto (DNAct) obtido.

Estas diferenças podem refletir, entre outros fatores, maior riqueza de mitocôndrias dos tecidos de couve-flor e coix utilizados nas extrações.

Para a extração de DNAm<sub>t</sub> de ervilha, soja, milho, e DNAct de coix utilizou-se menores quantidades de material. Isto se refletiu na obtenção de menor quantidade de DNA, não havendo, novamente, entre as espécies, uma relação proporcional entre o decréscimo da quantidade de tecido utilizada e a diminuição de DNA organelar obtido. Esta ausência de relação direta decorre de diferenças naturais entre as espécies, e talvez a falhas durante o processo de extração que possam ter afetado o rendimento.

Apesar das diferenças específicas no rendimento de DNAm<sub>t</sub>, decidiu-se que a quantidade de tecido ideal para as extrações é 200 g - 250 g devido a particularidades do protocolo empregado. A limitação, apesar de diminuir o rendimento, facilitou a extração, pois foi possível utilizar-se menor volume das soluções, e, assim, realizar cada passo de centrifugação uma única vez.

O DNAm<sub>t</sub> extraído de alfafa e o DNAct obtido de milho apresentaram-se contaminados com DNA genômico por razões desconhecidas, uma vez que o mesmo protocolo rendeu DNAm<sub>t</sub> e DNAct de excelente qualidade para as outras espécies analisadas. Assim o DNAct de milho não foi utilizado nos experimentos, e somente o DNAct de coix foi transferido para as membranas. Mesmo contaminado com DNA genômico o DNAm<sub>t</sub> de alfafa foi incluído no grupo de espécies utilizadas nos experimentos de hibridização e os resultados obtidos serão discutidos posteriormente.

### 6.1.1.2. DNA total de *M. chenopoda*

O protocolo descrito no item 5.5 produziu um DNA com qualidade suficientemente adequada para a realização dos experimentos de hibridização.

### 6.1.2. Amplificação das *orfs* do DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha*

As reações de amplificação resultaram em produtos abundantes e altamente específicos, indicando que as condições empregadas foram adequadas. As mesmas condições de reação foram usadas para amplificação das seis *orfs*, sendo que a única variável foi a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos.

O DNA usado para as reações de polimerização em cadeia foi o DNA total de *M. polymorpha*. *M. polymorpha* é uma espécie européia, adaptada a clima temperado, portanto não existe no Brasil. O DNA total dessa espécie nos foi gentilmente cedido pela Dra. Marie Catherine Boisselier Dubayle (Museu Nacional de História Natural - Laboratório de Criptógamas / Paris - França).

A determinação da quantidade de DNA total de *M. polymorpha* que seria utilizada nas as reações foi efetuada testando-se 5, 10, 25 e 50 ng de DNA total. Cinco nanogramas e 10ng mostraram resultados satisfatórios, estabelecendo-se, então, a utilização de uma ou outra quantidade, dependendo do volume final da reação.

Os fragmentos obtidos com as reações de PCR possuíam os tamanhos esperados, sendo eles: 246 pb (*orf86a*), 297 pb (*orf99*), 327 pb (*orf109*), 408 pb (*orf136*), 501 pb (*orf167*) e 621 pb (*orf207*).

### 6.1.3. Hibridizações

Para confecção da membrana 1Mp efetuou-se eletroforese de 1,7 µg de DNAm<sub>t</sub> de couve-flor digerido com *Eco RI* e da mesma quantidade deste DNAm<sub>t</sub> digerido com *Bam HI*, 1,5 µg de DNA total de *M. chenopoda* digerido com *Bam HI* e 100 ng de marcador de peso molecular λ (*Hind III*) / φx (*Hae III*). A membrana 1Mp foi usada para testar algumas condições de hibridização e lavagens em baixa estringência, de forma a se obter as melhores condições de hibridização, assim como para verificar a viabilidade do uso do DNA total da *M. chenopoda* como controle positivo das hibridizações.

Assim, realizou-se uma hibridização da membrana em condição de alta estringência (tal condição é descrita no item 5.10.6.2). O resultado foi uma forte ligação da sonda (fragmento do DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha*) a um único fragmento de alto peso molecular presente no DNA total de *M. chenopoda*, e nenhum sinal de hibridização com os fragmentos do DNAm<sub>t</sub> de couve-flor.

A hibridização indicou elevada similaridade de sequência entre a sonda e o fragmento complementar do DNA de *M. chenopoda*. Se, em condições de hibridização homóloga, ocorreu pareamento entre sonda e molde, concluiu-se que também ocorreria hibridização entre as outras *orfs* de *M. polymorpha* e o DNA de *M. chenopoda*, uma vez que as condições empregadas seriam de bem menor estringência. Estes resultados sugeriram grande similaridade destas sequência entre o DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha* e *M. chenopoda*.

Para a membrana 2Mp foram transferidos os fragmentos gerados por digestão enzimática de 7 diferentes DNAm<sub>t</sub>, 1 DNAct e o DNA total de *M. chenopoda*. Assim, 2 µg

do DNAm<sub>t</sub> de alfafa, batata, coix, couve flor, ervilha, milho e soja, bem como 2 µg do DNAct de coix (o DNAct de milho não foi usado pois apresentou baixa qualidade, em função de contaminação com DNA genômico e degradação), e o DNA total da briófitas foram digeridos, todos, com *Bam HI*. Migrou-se também 10 ng do marcador de peso molecular λ (*Hind III*) / φx (*Hae III*).

Foi preparada uma terceira membrana, contendo somente o DNA da briófitas em maiores quantidades, e uma pista desta membrana foi usada ao lado da membrana 2Mp, durante as hibridizações. Isto foi necessário para corrigir a pequena quantidade do DNA da briófitas presente na membrana 2Mp.

A membrana 2Mp foi empregada para as hibridizações com as seis *orfs* estudadas: *orf86a*, *orf99*, *orf109*, *orf167*, *orf207* e *orf136* (Figura 4). Nesta membrana estavam fixados os DNAm<sub>t</sub> das 7 espécies de plantas em estudo, o DNA total da briófitas *M. chenopoda* e o DNAct de coix, todos digeridos pela mesma enzima de restrição (Figura 4A). O DNA da briófitas foi colocado como controle positivo. O DNAct de coix foi utilizado por dois motivos: a) verificar se a *orf* utilizada como sonda era uma sequência unicamente mitocondrial; b) servir como controle de contaminação do DNAm<sub>t</sub> de coix com DNAct.

Caso a *orf* hibridizasse com o DNAm<sub>t</sub> e o DNAct de coix, revelando uma ou mais bandas com peso molecular idêntico nos dois DNA, concluir-se-ia que esta *orf* é uma sequência do DNAct de coix, e, possivelmente, do DNAct das outras plantas, uma vez que o genoma do cloroplasto é altamente conservado entre as espécies vegetais. Caso esta mesma *orf* hibridize com o DNAm<sub>t</sub> das outras espécies presentes seria necessário verificar se a hibridização estava ocorrendo devido a contaminação do DNAm<sub>t</sub> com DNAct, ou se

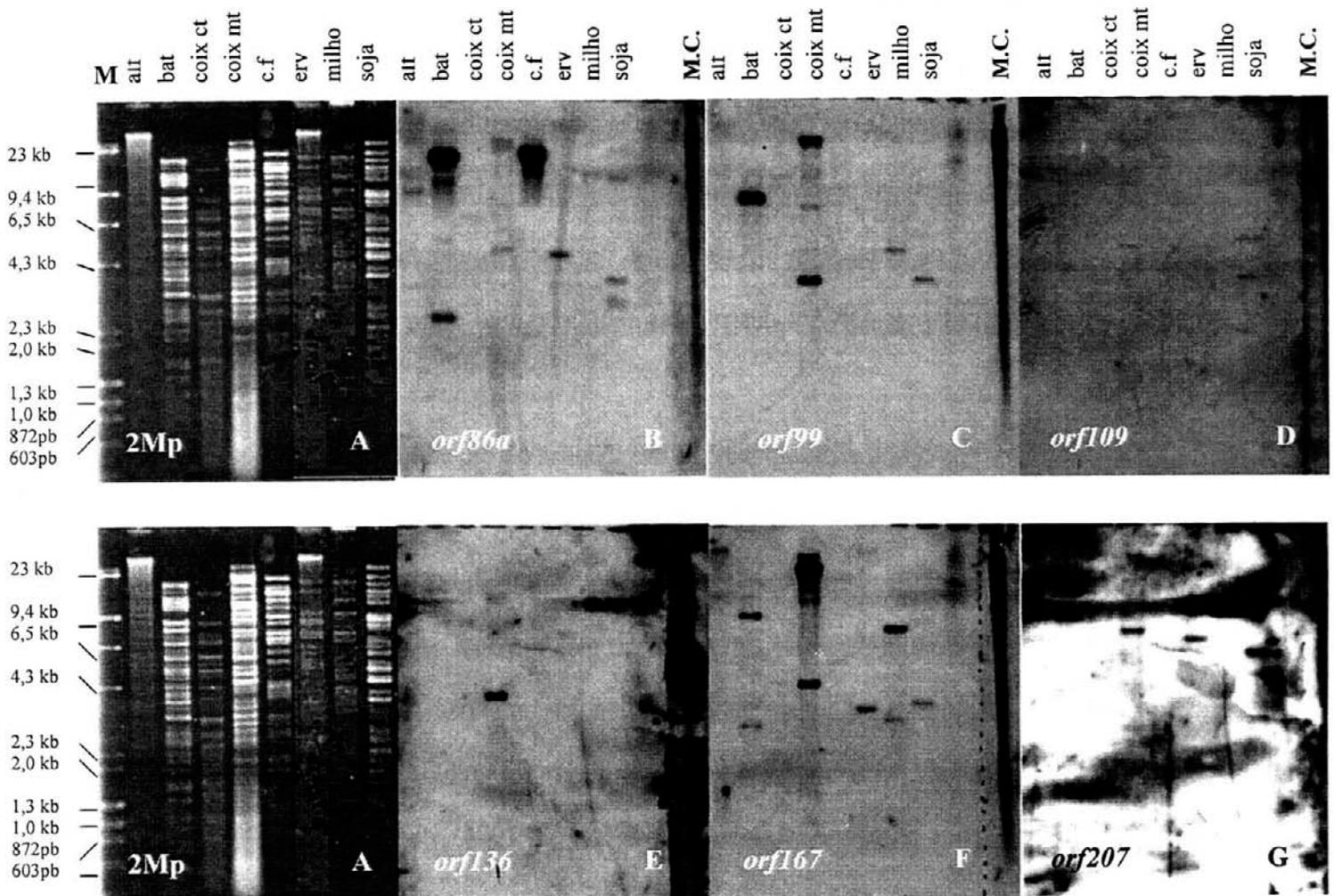


Figura 4 A: Gel que originou a membrana 2Mp e que contém o DNAm<sub>t</sub>, digerido com *Bam* *HI* e migrado através de eletroforese, de sete espécies de angiospermas: alfafa (alf), batata (bat), DNA cloroplastial de coix (coix ct), DNA mitocôndrial de coix (coix mt), couve-flor (c.f), ervilha (erv), milho e soja. B-G: Hibridização com a *orf36a* (B), *orf99* (c), *orf109* (D), *orf136* (E), *orf167* (F) e *orf207* (G). M: marcador  $\lambda$ *Hind* III /  $\phi$ *XHae* III. M.C.: DNA total de *M. chenopoda* presente em uma membrana hibridizada juntamente com a 2Mp.

---

tal *orf* encontra-se presente, de fato, no DNAm<sub>t</sub>, ou nos dois genomas. Vale ressaltar que não há possibilidades de contaminação inversa, ou seja, do DNAct com DNAm<sub>t</sub>, devido as centrifugações diferenciais efetuadas durante a extração.

Se a hibridização da *orf* de *M. polymorpha* fosse com bandas presentes no DNAm<sub>t</sub> e DNAct, que apresentassem pesos moleculares diferentes, teríamos uma *orf* conservada no DNAct e no DNAm<sub>t</sub> de coix. Esta *orf* não seria, portanto, unicamente mitocondrial. *Orfs* que fossem encontradas no DNAct das plantas estudadas não eram de interesse para este trabalho.

Várias condições de hibridização foram analisadas no estudo da homologia entre as *orfs* usadas como sonda e o DNAm<sub>t</sub> das espécies vegetais estudadas. As primeiras condições testadas foram de alta estringência, tanto na hibridização (com 50% de formamida e a 42°C) quanto nas lavagens (lavagens com soluções pouco salinas). Posteriormente utilizou-se condições para hibridização em baixa estringência e testou-se algumas temperaturas de lavagem. Estas novas condições foram baseadas nos experimentos de clonagem dos genes mitocondriais *cob* (Dawson et al., 1984), do gene para subunidade  $\alpha$  do complexo F<sub>1</sub>-ATPase (Issac et al., 1985a), e *cox1* (Issac et al., 1985b), em plantas superiores. Todos estes genes foram clonados empregando-se hibridização com sondas mitocondriais oriundas de levedura, em condições que permitiram hibridização entre fragmentos com similaridade igual ou maior a 50%. Este patamar mínimo de similaridade foi, portanto, adotado neste trabalho, uma vez que, tendo funcionado para sondas oriundas de levedura, acreditou-se que seria adequado para sondas originárias de plantas inferiores.

As condições que foram empregadas na hibridização da *orfs* com a membrana 2Mp, cujos resultados são apresentados a seguir, estão descritas no item **5.10.6.1**.

### 6.1.3.1. Hibridização do fragmento correspondente à *orf86a*

Observou-se hibridização específica com fragmentos do DNAMt de batata e couve-flor. Algumas bandas puderam ser visualizadas no DNAMt de alfafa, coix, ervilha, milho e soja, porém, apresentando menor intensidade (**Figura 4B**). Após nova lavagem da membrana a 52°C, com a mesma solução empregada na lavagem anterior, e exposição por 5 dias, observou-se sinal apenas dos fragmentos do DNAMt de batata e couve-flor.

### 6.1.3.2. Hibridização do fragmento correspondente à *orf99*

O resultados indicaram uma banda homóloga de sinal autoradiográfico intenso no DNAMt de batata, duas no DNAMt de coix, uma no DNAMt de milho e uma no DNAMt de soja (**Figura 4C**). Este resultado mostra que a *orf99* possui homologia a fragmentos no DNAMt destas 4 espécies, e não está presente no DNAct de coix. Não foi observada hibridização da *orf* com o DNAMt de alfafa, mesmo empregando-se condições de estringência muito baixa. Isto se deve ou a ausência total de fragmentos homólogos, ou a pequena quantidade de DNAMt presente na membrana. O DNAMt de couve-flor e ervilha só apresentaram sinais de hibridização em condições muito pouco seletivas, o que indica que não possuem sequências com similaridade suficiente para serem consideradas homólogas a *orf99*.

É interessante ressaltar a existência de sequência homóloga a *orf99* no DNAMt de soja e ausência no DNAMt de ervilha. Nugent e Palmer (1991) relataram que o gene *cox2* migrou da mitocôndria para o núcleo durante a evolução das Angiospermas. Entre um grupo de leguminosas estudadas, o gene foi encontrado na mitocôndria e no núcleo de

ervilha, soja e em *Phaseolus vulgaris* ("common bean"), enquanto que somente no núcleo de *Vigna radiata* ("mung bean") e *Vigna unguiculata* ("cowpea"), tendo sido, nestas espécies, transferido para o núcleo. Além disto, verificou-se que o gene é transcrito, unicamente, na mitocôndria de ervilha, e, unicamente, no núcleo das outras espécies estudadas. Um estudo mais aprofundado da *orf99* no DNAm t e nuclear da ervilha poderia revelar se a sequência homóloga a *orf99* fora transferida para o núcleo.

#### 6.1.3.3. Hibridização do fragmento correspondente à *orf109*

A *orf109* hibridizou-se fracamente com dois fragmentos do DNAm t de soja, não havendo intensificação do sinal mesmo após 7 dias de exposição (**Figura 4D**). Este resultado mostrou que, além de ser pouco conservada no DNAm t das espécies em estudo, a *orf109* não apresenta muita similaridade de sequência aos fragmentos com os quais se hibridizou, quando comparada às outras *orfs* estudadas. Utilizando-se condições de hibridização menos estridentes, poderiam ser revelados outros fragmentos. Entretanto estes teriam ainda menor similaridade a *orf109*. Conclui-se que a *orf109* ou só está conservada no DNAm t de soja, ou os fragmentos com os quais se hibridiza neste DNA apresentam tão baixa similaridade, que não se pode considerá-los como sendo sequências homólogas à *orf109*. Desta forma, pode ser que a *orf109* esteja ausente do DNAm t das espécies avaliadas, e, conseqüentemente, do DNAm t das plantas superiores. A hibridização da *orf109* foi repetida. O resultado obtido confirmou a ausência de conservação da *orf109* no DNAm t da maioria das espécies estudadas, exceção feita às duas bandas presentes no DNAm t de soja.

#### 6.1.3.4. Hibridização do fragmento correspondente à *orf136*

A *orf136* hibridizou-se apenas com o DNAm<sub>t</sub> de coix (**Figura 4E**), sendo, portanto, pouco conservada entre as espécies estudadas e, provavelmente, entre as Angiospermas em geral.

Esta *orf* foi marcada utilizando-se o "kit" da Gibco BRL e a autoradiografia mostrou-se repleta de manchas. Concluiu-se, posteriormente, que o problema era o "kit" utilizado para a marcação da sonda, que era empresa Gibco BRL ("Random Primer Labeling Systems"). Ou o "kit" empregado estava com problemas de natureza desconhecida, ou as condições de hibridização em baixa estrigência, que foram otimizadas utilizando-se o "kit" da empresa Promega, não podem ser empregadas para o uso do "kit" da Gibco BRL. Resultados paralelos, os quais empregaram o "kit" da empresa Gibco BRL para a marcação de sondas homólogas (cujas condições de hibridização são bem mais estrigentes), revelaram um perfeito funcionamento deste "kit".

#### 6.1.3.5. Hibridização do fragmento correspondente à *orf167*

O DNAm<sub>t</sub> de batata, coix, ervilha, milho e soja apresentaram sequências homólogas a *orf167* (**Figura 4F**). Não houve hibridização com o DNAct de coix, o DNAm<sub>t</sub> de alfafa, e o de couve-flor. Concluiu-se que, se o DNAm<sub>t</sub> de couve-flor e o DNAct de coix possuem fragmentos homólogos a *orf167*, estes tem similaridade baixa, de modo que teria sido necessário alterar as condições de estrigência para detectá-los

Um detalhe importante pôde ser observado quando se sobrepôs o filme autoradiográfico obtido da hibridização da *orf99*, com o filme obtido da hibridização da

*orf167*. Observou-se que o mesmo fragmento do DNAm<sub>t</sub> de coix e de soja hibridizou-se à *orf99* e à *orf167*. Verifica-se na **Figura 3** que estas duas *orfs* são "vizinhas" no DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha*. Assim, provavelmente, as sequências do DNAm<sub>t</sub> de coix e soja homólogas a estas duas *orfs* apresentam a mesma organização das duas *orfs* no DNAm<sub>t</sub> de *M. polymorpha*.

#### 6.1.3.6. Hibridização do fragmento correspondente à *orf207*

Devido aos problemas gerados pelo "kit" empregado (da empresa Gibco BRL), a membrana foi lavada 48°C. Esta temperatura foi tomada por precaução, uma vez que, caso demonstrasse não ter sido suficiente, seria fácil simplesmente relavar a membrana a uma temperatura mais alta. O filme autoradiográfico obtido apresentou-se com manchas, entretanto uma lavagem a 50°C certamente não iria melhorar o sinal, de forma que não foi tentada. Apesar do resultado possuir muitas manchas, pôde-se tirar conclusões claras. A *orf207* hibridizou-se com bandas únicas, presentes no DNAm<sub>t</sub> de batata, coix, ervilha e soja (**Figura 4G**). Assim, esta sequência revelou-se bem conservada entre as plantas estudadas. Curiosamente, a *orf207* mostrou-se presente no DNAm<sub>t</sub> de apenas uma das duas monocotiledôneas analisadas. Estes resultados indicaram que a *orf207* é uma sequência interessante para estudos mais aprofundados sobre sua conservação no DNAm<sub>t</sub> de outras plantas superiores. Há possibilidades da *orf207* ser um gene ou alguma sequência importante para o DNAm<sub>t</sub> de plantas, que se conservou desde a briófitas até as plantas superiores estudadas. A clonagem desta sequência a partir do DNAm<sub>t</sub> das plantas disponíveis, estudos de expressão por técnicas de "Northern Blotting" e, talvez, estudos de função da proteína codificada poderiam revelar a existência de um novo gene.

## 6.2. 2<sup>o</sup> ETAPA: Estudo de estrutura do fragmento do DNAm<sub>t</sub> de coix homólogo à *orf167*

Quatro das seis *orfs* estudadas, a saber, *orf86a*, *orf167*, *orf99* e *orf207*, apresentaram-se conservadas entre as plantas analisadas. Dentre estas, a *orf167* foi a mais conservada, possuindo homologia com o DNAm<sub>t</sub> de batata, coix, ervilha, milho e soja. O fragmento homólogo presente no DNAm<sub>t</sub> de coix foi o que gerou o sinal autoradiográfico mais intenso, o que indicou que a similaridade entre as sequências da *orf167* e do fragmento homólogo presente no DNAm<sub>t</sub> de coix devia ser maior que a similaridade entre a sequência desta *orf* e a sequência dos fragmentos homólogos detectados na outras espécies (batata, ervilha, milho e soja). Por este motivo escolheu-se o fragmento homólogo à *orf167* de *M. polymorpha* identificado no DNAm<sub>t</sub> de coix para estudos de estrutura e transcrição.

### 6.2.1. Hibridização da *orf167* com as membranas 6Mp e 7Mp

Para confecção da membrana 6Mp utilizou-se o DNAm<sub>t</sub> de coix (2 µg) digerido com as enzimas *Bam HI*, *Bgl I*, *Eco RI*, *Hind III*, *Kpn I*, *Nru I*, *Pst I*, *Sal I*, e *Xho I*, e fracionado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A membrana 7Mp foi confeccionada com DNAm<sub>t</sub> de coix (2 µg) digerido com *Bgl II*, *Eco RV*, *Mlu I*, *Nco I*, *Pvu I*, *Pvu II*, *Sma I* e *Sst I*. As digestões foram efetuadas por duas horas a 37°C.

A hibridização foi realizada utilizando-se as condições descritas no item 5.10.6.1. Entretanto as lavagens foram realizadas a 52 °C. O resultado é mostrado na **Figura 5**.

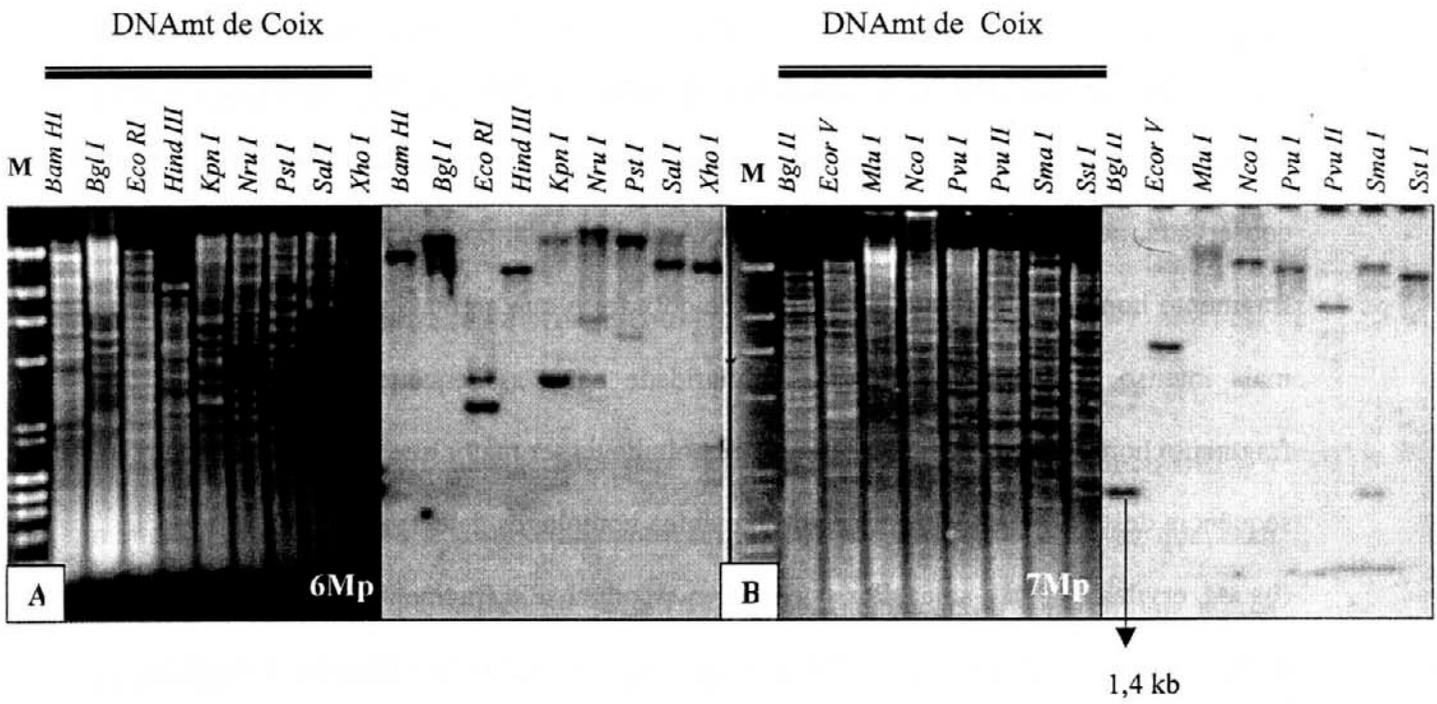


Figura 5: Géis que deram origem às membranas 6Mp (A) e 7Mp (B) após eletroforese do DNAMt de coix digerido com várias enzimas, e as respectivas autoradiografias obtidas através da hibridização das membranas com a *orf167*. M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X *Hae III*. Indicado por seta está o fragmento de 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*, homólogo a *orf167*, que foi isolado e clonado.

Na **Figura 5B** observa-se uma banda de 1,4 kb obtida pela digestão do DNAm<sub>t</sub> de coix com *Bgl II*, homóloga à *orf167*. Este fragmento foi escolhido para ser clonado por ter sido o único que se hibridizou com a sonda após digestão com esta enzima, o que garantiria que toda sequência homóloga à sonda estaria presente neste fragmento. Além disto ele foi o menor fragmento, gerado pela digestão com as diferentes enzimas, que se hibridizou com a *orf167*.

#### **6.2.2. Clonagem do fragmento de 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* do DNAm<sub>t</sub> de coix homólogo a *orf167* de *M. polymorpha* (clone A8)**

Para isolamento do fragmento homólogo identificado na **Figura 5B** foi necessário preparar um banco subgenômico dos fragmentos do DNAm<sub>t</sub> de coix, que variavam de 1,0 kb a aproximadamente 1,8 kb. Esta medida foi importante porque a sequência homóloga estava em uma região de pouca definição das bandas, ou seja, não era possível distinguir e isolar a banda correspondente ao fragmento de interesse. Foi necessária tal amplitude na variação do tamanho dos fragmentos isolados para certificar-se de que o fragmento desejado seria recuperado. Os fragmentos isolados no bloco de gel foram purificados, ligados ao vetor pBluescript e usados para transformar células competentes de *E. coli*. As colônias recombinantes foram repicadas em placas de microtítulo. Uma alíquota de cada cultura foi utilizada em ampliações por PCR. Cinco microlitros de cada produto de amplificação migrou através de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo posteriormente transferido para membranas de “nylon” gerando as membranas Gel1 e Gel2. A hibridização destas membranas com a *orf167* identificou dois clones positivos (homólogos à *orf167*). Estes clones foram o A8 e o E11 (**Figura 6**).

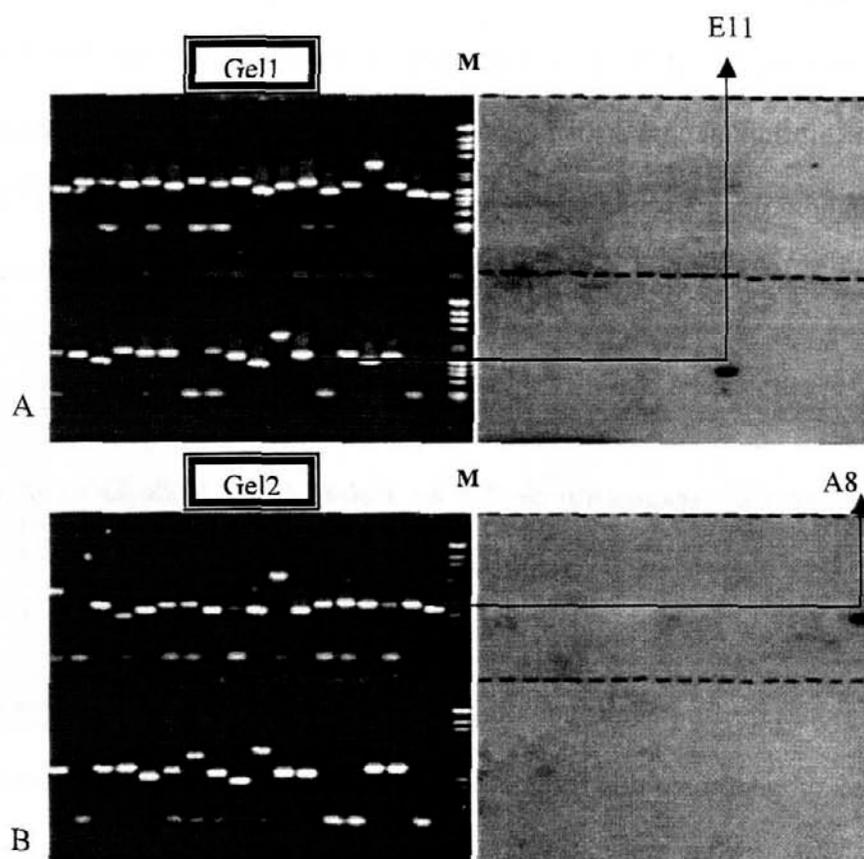


Figura 6: Géis que originaram as membranas Gel1 (A) e Gel2 (B), as quais contém o produto de amplificação por PCR de 72 clones do banco subgenômico de coix migrados através de eletroforese. Ao lado de cada foto de gel, os resultados autoradiográficos da hibridização da respectiva membrana com a *orf167*. M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ *XHae III*. Indicado por setas estão os clones positivos A8 e E11.

Os dois clones foram analisados por digestão com enzimas de restrição. As digestões com *Hind III*, *Spe I*, *Sst I* e *Xho I* dos insertos amplificados por PCR mostraram claramente que os dois clones eram idênticos, e estavam inseridos no vetor na mesma orientação. O clone A8 foi utilizado nos estudos que se seguiram.

A digestão do plasmídeo contendo o clone A8 com as enzimas *Hind III* e *Sst I*, as quais estão no "polylinker" do vetor, mostraram que este clone não possui sítio interno para corte desta enzimas. Portanto, quando empregadas separadamente, estas enzimas linearizavam o plasmídeo. Estas enzimas foram utilizadas em conjunto para poder liberar o inserto do vetor. Não foi possível liberar o inserto através do uso da enzima *Bam HI*, a qual foi empregada para clonagem, pois as extremidades do inserto foram originadas pelo corte com *Bgl II*. A colocação do inserto no sítio *Bam HI* destruiu ambos os sítios, impossibilitando sua retirada por *Bam HI* ou *Bgl II*.

O clone A8 foi digerido por *Hind III* e *Sst I*, os fragmentos gerados foram separados por eletroforese. O inserto de 1,4 kb foi isolado do gel, purificado e empregado como sonda em hibridização de alta estrigência com a membrana "DNamt coix-clone".

A membrana foi confeccionada com 2 µg do DNamt de coix digerido por *Bgl II* (enzima que gerou o fragmento homólogo clonado), *Eco RV* e *Hind III*, e 20 ng do inserto purificado do clone A8 .

Esta membrana foi hibridizada com a *orf167* em condições de baixa estrigência (item 5.10.6.1) e com o inserto do clone A8 em condições de alta estrigência (item 5.10.6.2). Estas hibridizações tiveram por objetivo comprovar que o clone A8 possuía o fragmento homólogo à *orf167* presente no DNamt de coix. O resultado indicou que o clone

A8 possui a sequência homóloga à *orf167* (Figura 7), dado que reconheceu, no DNAm de coix, as mesmas bandas que a *orf167* reconhece.

### 6.2.3. Construção do Mapa de Restrição do clone A8 e identificação da região de homologia com a *orf167* de *M. polymorpha*

Para montagem do mapa de restrição inicialmente digeriu-se o plasmídeo contendo o inserto de 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* (clone A8) com 17 enzimas (Figura 8). Os resultados obtidos indicaram que o inserto não tem sítio de corte para as enzimas de restrição *Bam HI*, *Bgl I*, *Bgl II*, *Eco RV*, *Hinc II*, *Kpn I*, *Not I*, *Pst I*, *Sal I*, *Sma I* e *Sst I*. *Bam HI* não possui sítio de restrição no vetor, portanto verificou-se no gel, após reação de digestão com esta enzima, as formas circularizadas relaxadas e super enroladas do plasmídeo. As enzimas *Eco RV*, *Hinc II*, *Kpn I*, *Not I*, *Pst I*, *Sal I*, *Sma I* e *Sst I* só possuem um sítio no vetor, na região do "polylinker". A digestão com estas enzimas só gerou somente uma banda de 4,4 kb, que equivale ao plasmídeo linearizado. As enzimas *Bgl I* e *Pvu I*, por sua vez, possuem dois sítios de restrição no vetor, fora da região do "polylinker". A digestão com as mesmas produziu duas bandas cujos tamanhos concordam com o tamanho de bandas previsto com o corte das enzimas nos sítios conhecidos do vetor. Este fato indicou que estas enzimas também não possuem sítios de corte no inserto (Figura 8).

A digestão com *Ava I* levou a formação de duas bandas, uma de 1,1 kb e outra de 3 kb. Sabendo-se que *Ava I* possuía dois sítios no vetor e sabendo-se a posição destes sítios, concluiu-se que a banda de 3 kb deveria corresponder a um fragmento formado por parte do vetor mais um pedaço de aproximadamente 300 pb do inserto. A banda de 1,1 kb

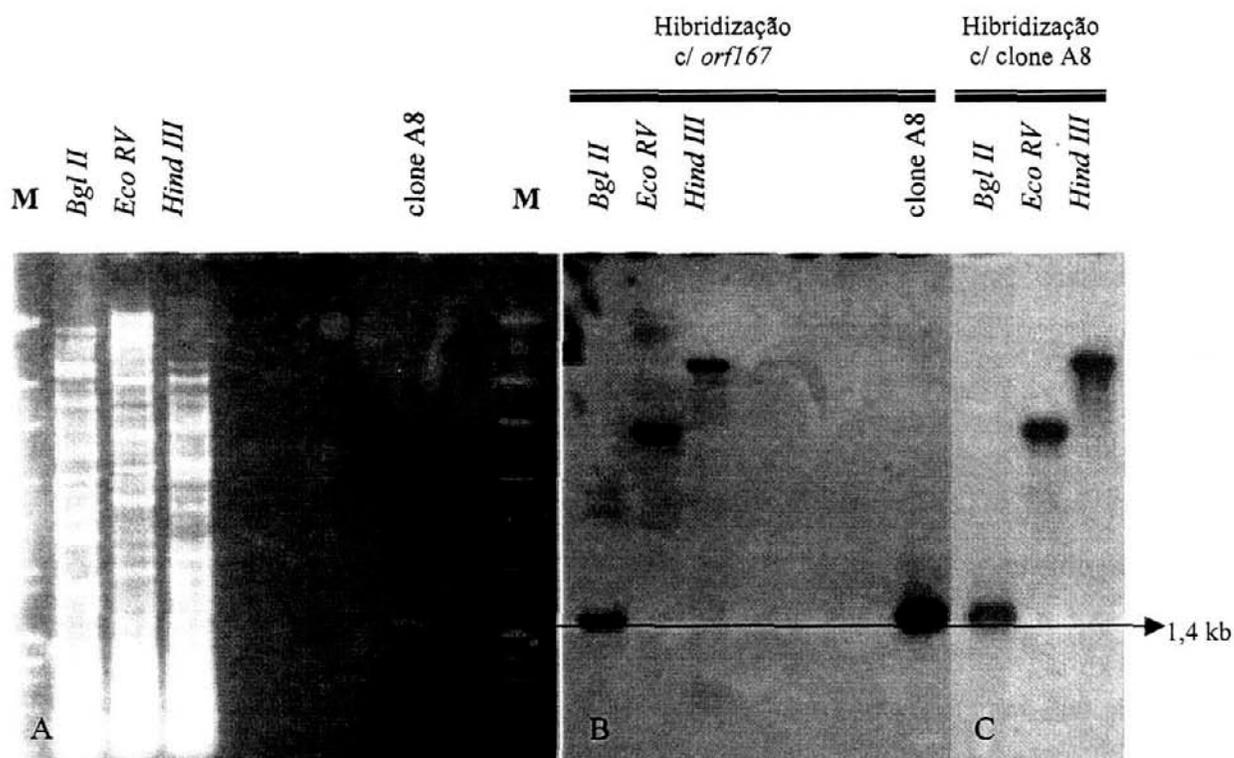


Figura 7 A: Gel contendo o DNAm<sub>t</sub> de coix digerido com as enzimas especificadas, e o clone A8, migrados através de eletroforese. B e C: autoradiografias resultantes da hibridização da membrana "Coix-clone" com a *orf167* (B), e com o clone A8 (C). M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X*Hae III*.

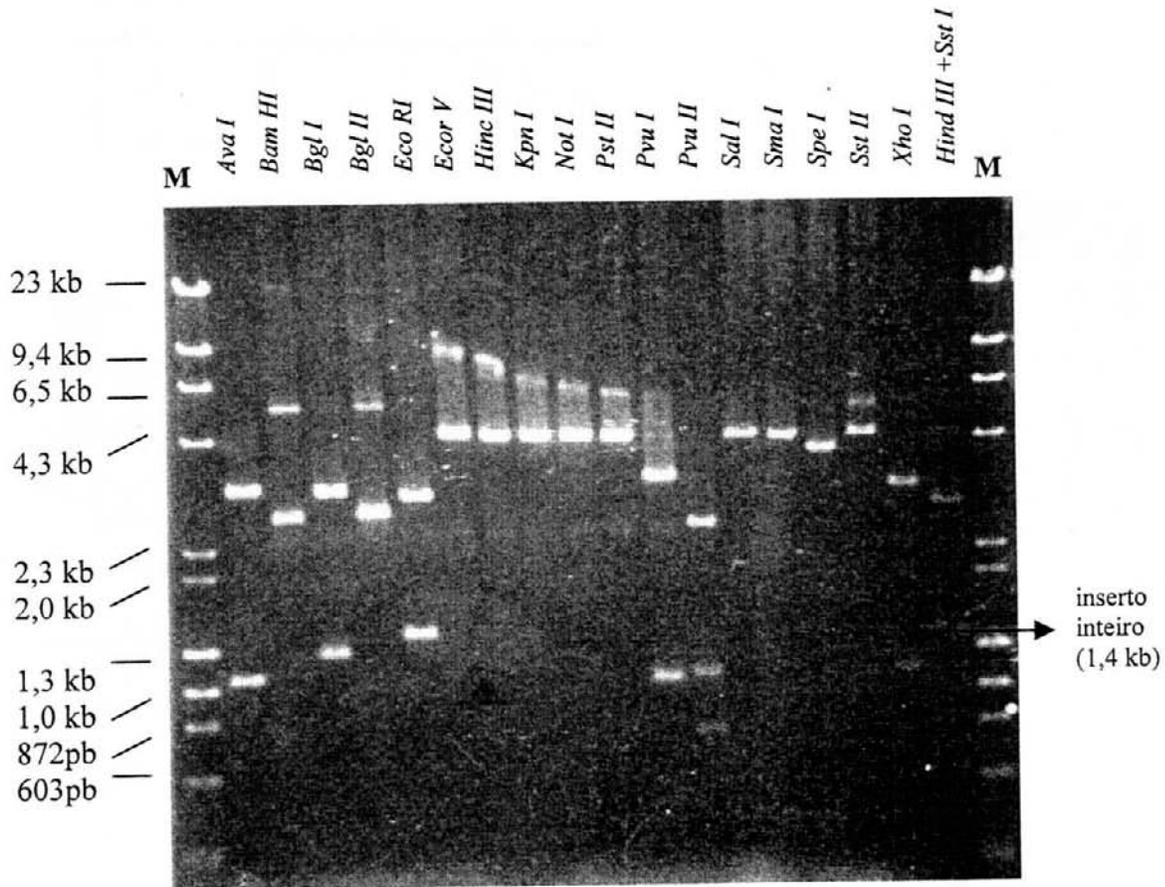


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose do clone A8 digerido com diferentes enzimas de restrição. *Hind III* e *Sst I* são digestões controle (liberam o inserto inteiro). M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X*Hae III*.

corresponderia ao restante do inserto. Porém, com estes resultados, ainda não era possível identificar a posição do sítio no inserto, em relação ao "polylinker" do vetor.

A enzima *Eco RI* gerou duas bandas: uma de 3 kb (vetor) e outra de 1,4 kb (inserto quase inteiro). *Eco RI* possui somente um sítio no vetor, de modo que a presença de duas bandas indicou a existência de outro sítio *Eco RI* no inserto. Em função da localização do sítio de *Eco RI* no vetor foi possível afirmar que o sítio de *Eco RI* do inserto está localizado bem na extremidade do fragmento clonado, do lado oposto àquele onde localiza-se o sítio *Eco RI* no vetor (**Figura 8**).

A digestão com *Pvu II* proporcionou três bandas: 2,5 kb, 1,1 kb e 0,8 kb. *Pvu II* possui dois sítios no vetor. Os resultados obtidos indicaram que havia também um sítio para esta enzima no inserto, o qual estaria dividindo-o em um fragmento de 600 pb e outro de 800 pb. Assim o primeiro fragmento, mais uma parte do vetor (mais ou menos 200 pb), geraram a banda de 0,8 kb, enquanto que o segundo fragmento, adicionado a outra região do vetor (aproximadamente 300 pb), originaram a banda de 1,1 kb. A terceira banda corresponderia ao restante do vetor (**Figura 8**).

A utilização da enzima *Spe I* revelou a existência de um sítio para esta enzima no inserto. Esta enzima possui um sítio no "polylinker" do vetor, porém a digestão com ela gerou uma banda de aproximadamente 4 kb. Portanto, *Spe I* possuía um sítio no inserto, cujo corte gerou um fragmento de 400 pb. Este sítio estava localizado na extremidade do inserto, próxima ao sítio do vetor. O fragmento não aparece no gel provavelmente porque estava em uma quantidade insuficiente para ser detectado (**Figura 8**).

Finalmente, a enzima *Xho I* possui um sítio no vetor mas sua utilização na digestão levou a formação de duas bandas, indicando a existência de um sítio *Xho I* no inserto, na extremidade oposta ao sítio *Xho I* do "polylinker". Assim, a banda de 1,1 kb encontrada

seria constituída por 1 kb de inserto e 100 pb do vetor, e a banda de 3,2 kb seria resultante do restante do vetor e 300 pb do inserto.

Realizou-se várias digestões duplas, empregando-se a enzima para qual se desejava confirmar a presença e a localização do sítio no inserto, e uma outra enzima cuja posição do sítio já havia sido confirmada no inserto. Utilizou-se também enzimas sem sítio no inserto, mas com sítio de corte em posição estratégica no vetor.

As membranas “Mapa de restrição I” e “Mapa de restrição II” foram confeccionadas para auxílio na construção do mapa de restrição do clone A8 e para identificar-se a região do clone homóloga a *orf167*. Elas foram produzidas pela eletroforese, em gel de agarose 1%, dos fragmentos gerados pelas digestões duplas do clone A8, e transferência destes fragmentos para as membranas de "nylon". As membranas foram hibridizadas com a *orf167* (**Figura 9**). A união dos dados obtidos com as digestões e as hibridizações possibilitou a construção do mapa de restrição do clone A8, e identificar nele a localização exata da região de homologia à *orf167*. Neste mapa encontra-se evidente a região homóloga à *orf167*, presente dentro do clone A8, a qual foi então subclonada e denominada Sub1 (**Figura 10**).

#### **6.2.4. Subclonagem**

##### **6.2.4.1. Clonagem do subclone 1**

Cerca de 1,6 µg do clone A8 foram digeridos com as enzimas *Spe I* e *Pvu II*. O fragmento de 500 pb, formado pela digestão, foi isolado do gel, purificado e inserido no plasmídeo pBluescript, no sítio para *Sma I*. Bactérias *E. coli* foram transformadas com os

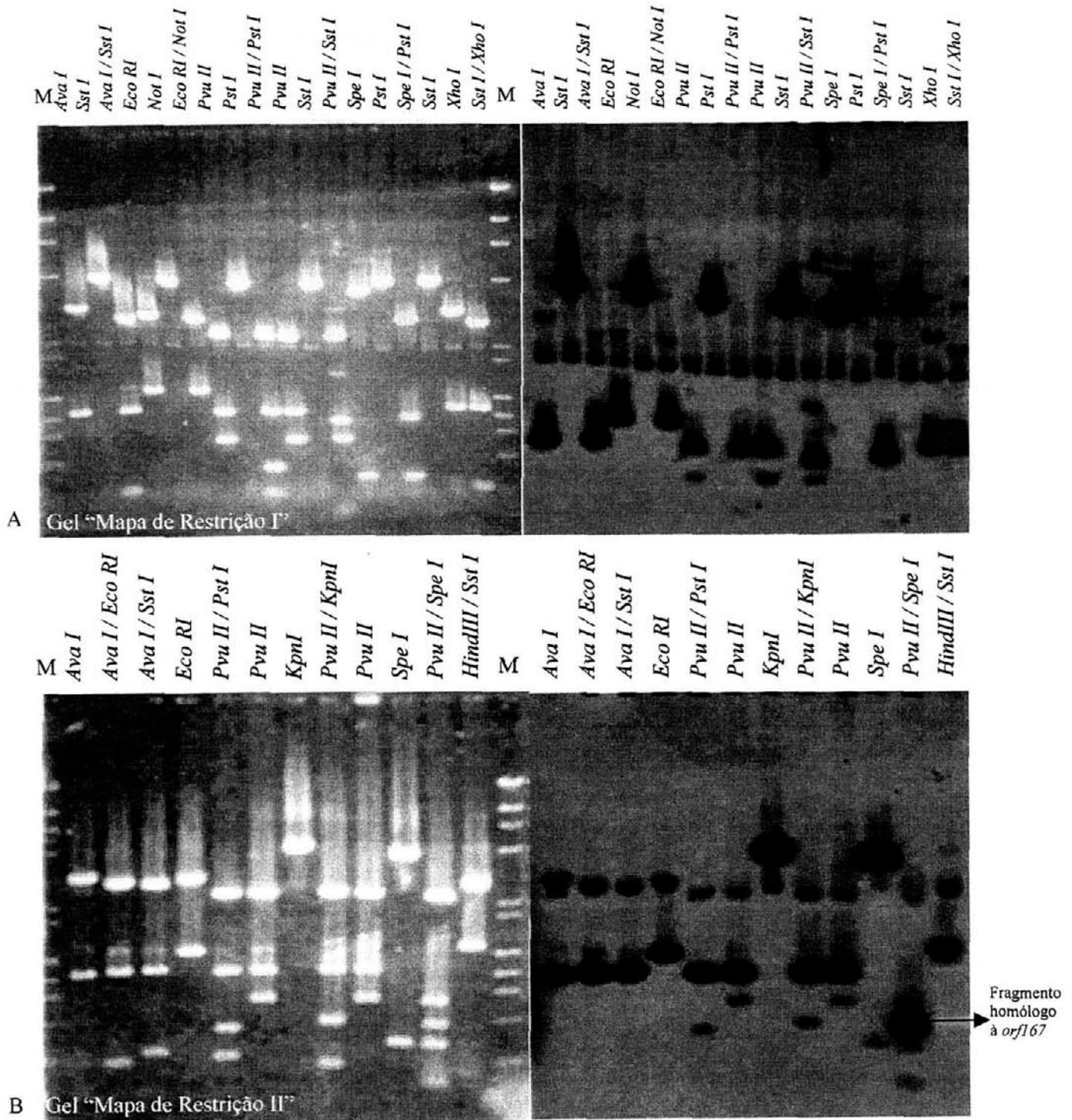


Figura 9: Géis que deram origem às membranas "Mapa de Restrição I" (A) e "Mapa de Restrição II" (B). Ao lado de cada foto do gel estão as autoradiografias obtidas após hibridização da *orf167* com as membranas. *Hind III* e *Sst I* são digestões controle (liberam o inserto inteiro). M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X*Hae III*.

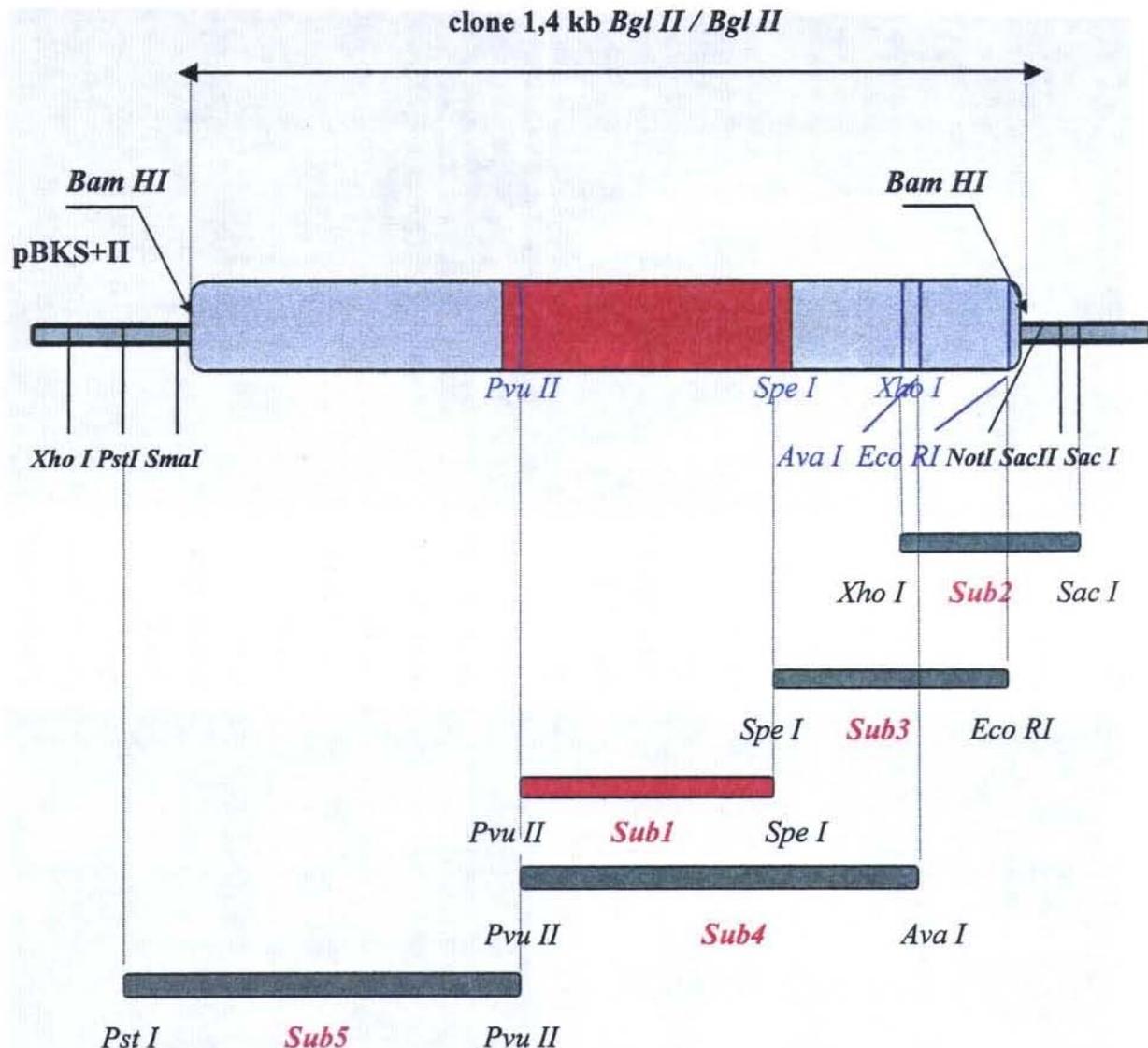


Figura 10: Mapa de restrição indicando (fora de escala) os sítios de restrição presentes no clone 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* e no "polylinker" do plasmídeo. Os 5 subclones obtidos são indicados: Sub1, Sub2, Sub3, Sub4 e Sub5. O Sub1 (barra em vermelho) possui a região de homologia à *orf167*, a qual está também evidenciada em vermelho no clone 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*.

plasmídeos e plaqueadas em meio sólido. Doze colônias “brancas” foram escolhidas ao acaso para serem analisadas na busca daquela que continha o fragmento de 500 pb. Para a análise, extraíu-se o DNA plasmidial das bactérias, e digeriu-se o plasmídeo com as enzimas *Eco RI* e *Bam HI*, presentes no "polylinker" do vetor e sem sítio de restrição na região clonada. Seis colônias possuíam o inserto desejado de 500pb. A **Figura 11** mostra o inserto de 0,5 kb *Spe I / Pvu II* liberado do plasmídeo após digestão.

#### **6.2.4.2. Conservação do fragmento de 500 pb *Spe I / Pvu II* (subclone 1) no DNAmT de outras espécies de plantas superiores**

O fragmento de 500 pb *Spe I / Pvu II* foi marcado radioativamente e empregado como sonda em uma hibridização em alta estrigência com uma membrana que possuía o DNAmT (2 µg) de sete espécies de plantas superiores digeridos com *Bam HI* (alfafa, batata, coix, couve-flor, ervilha, milho e soja). O resultado (**Figura 12**) obtido indicou claramente que sequências homólogas ao Sub1 foram encontradas no DNAmT de todas as espécies presentes na membrana. A existência de mais de uma banda por DNAmT sugeriu que a sequência homóloga estava presente em mais de uma região no genoma, que a sequência homóloga apresentava um sítio *Bam HI*, ou que o fragmento estaria reconhecendo mais de um gene.

Com estes resultados ficou evidente a conservação do fragmento 0,5 kb *Spe I / Pvu II*, originado do DNAmT de coix e homólogo a *orf 167* de *M. polymorpha*. Tal fato constituiu-se em mais uma evidência de que este fragmento correspondia a um gene mitocondrial.

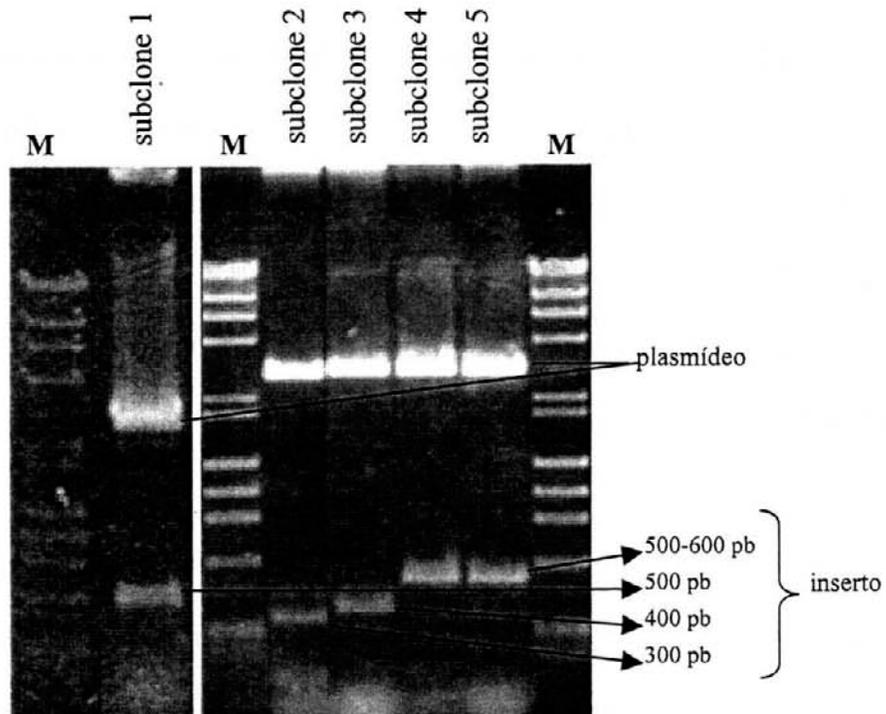


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos subclones 1 a 5 após digestão com enzimas que liberam o inserto. M: marcador de peso molecular  $\lambda$ Hind III /  $\phi$ XHae III.

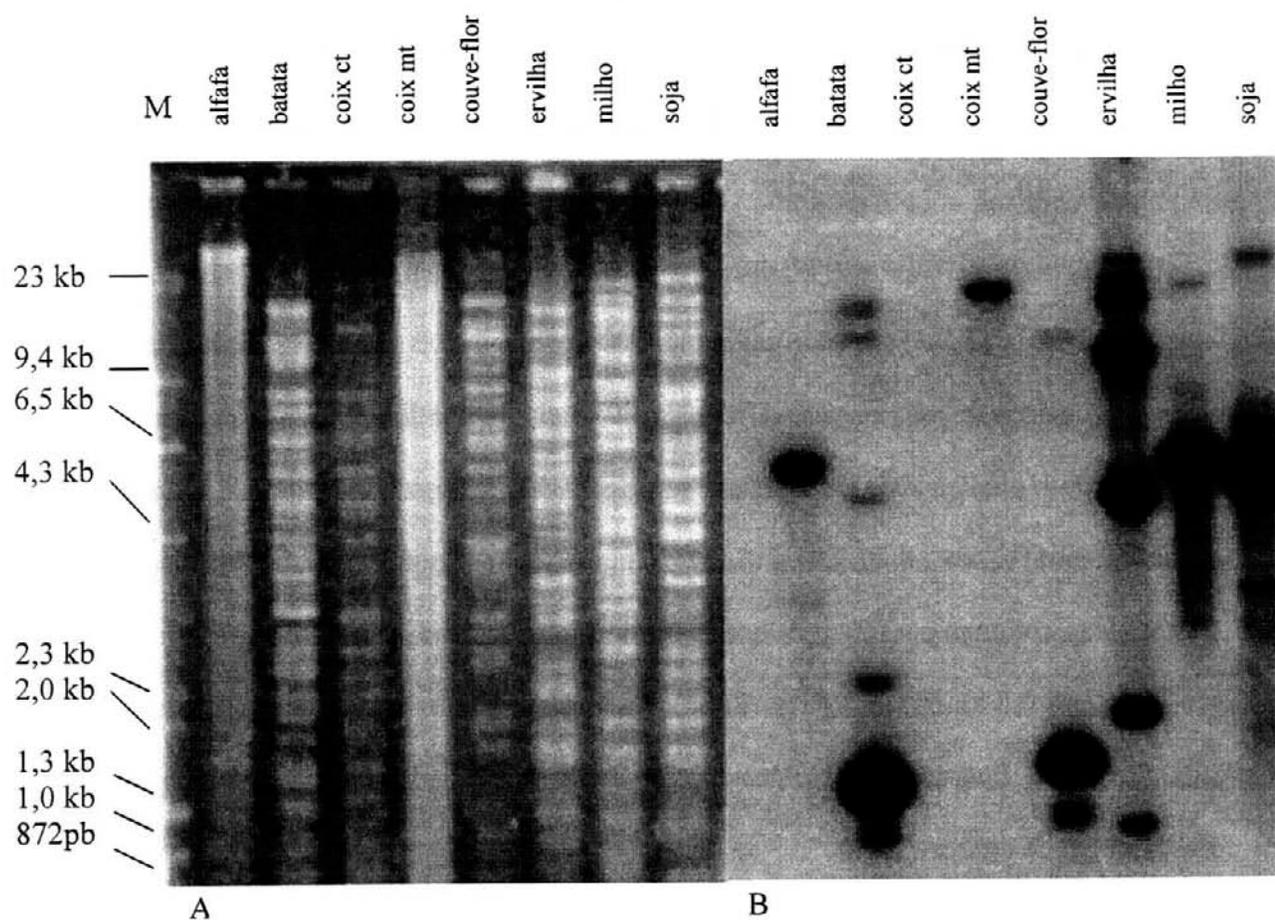


Figura 12 A: Gel contendo o DNAm<sub>t</sub> das espécies especificadas digeridos com *Bam* HI. B: Autoradiografia mostrando o resultado da hibridização do fragmento 0,5 kb *Pvu* II / *Spe* I (Sub1) com a membrana originada deste gel. M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind* III /  $\phi$ X*Hae* III.

### 6.2.4.3. Clonagem dos subclone 2, subclone 3, subclone 4 e subclone 5

Para a obtenção dos fragmentos que geraram estes 4 subclones digeriu-se o clone 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* com as enzimas adequadas, migrou-se o produto de digestão em gel de agarose, isolou-se e purificou-se os fragmentos de interesse. O mapa de restrição mostrando as regiões cobertas pelos insertos dos subclones dentro do clone 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* pode ser visto na **Figura 10**.

Os fragmentos foram inseridos no plasmídeo pBluescript e transformados em *E. coli*, linhagem DH5 $\alpha$ . Para seleção das colônias transformadas com os plasmídeos recombinantes utilizou-se o ensaio IPTG/X-gal. Seis colônias brancas de cada transformação foram analisadas para verificar se possuíam o inserto correto. Uma colônia possuía o fragmento 0,3 kb *Sst I* / *Xho I* (Sub2), cinco possuíam o inserto 0,4 kb *Eco RI* / *Spe I* (Sub3), duas colônias possuíam o inserto 0,6 kb *Ava I* / *Pvu II* (Sub4), e outras cinco continham o inserto 0,5 kb *Pvu II* / *Pst I* (Sub5). Na **Figura 11** observa-se os insertos dos clone Sub2, 3, 4, e 5, liberados após digestão com as enzimas adequadas e separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%.

### 6.2.5. Sequenciamento dos subclones

As duas fitas dos 5 subclones foram sequenciadas nos sequenciadores automáticos existentes no CBMEG e na University of British Columbia, no Canadá. A união dos resultados possibilitou-nos conhecer as sequências dos cinco subclones.

Durante a análise destas sequências retirou-se o que se identificou com sendo pertencente ao "polylinker" do vetor, e utilizou-se o programa Seqman (DNASTAR, Inc. 1989-1992) para alinhá-las.

O sequenciamento revelou um dado interessante sobre os sítios de corte das enzimas de restrição identificados com o mapa de restrição mostrado na **Figura 10**. O sítio reconhecido pela enzima *Xho I* (CTCGAG) é exatamente o mesmo reconhecido pela enzima *Ava I* (CPyCGPuG), não existindo dois sítios separados por uma pequena região conforme mostrado na **Figura 10**. O tamanho do fragmento verificado com o sequenciamento foi de 1.422 bases, bem próximo do estimado pela eletroforese em gel de agarose. Pôde-se identificar os sítios do "polylinker" do vetor, os quais foram previstos estarem presentes no fragmento 0,3 kb *Sac I / Xho I*, devido ao processo de clonagem (ver **Figura 10**), o sítios *Bam HI+Bgl II*, que indicam as extremidades do clone 1,4 kb *Bgl II / Bgl II*, e o sítio *Sma I* previsto estar na extremidade do fragmento 0,5 kb *Pvu II / Pst I*. O sítio *Pst I* não aparece provavelmente porque ele foi eliminado durante a reação de preenchimento realizado pela enzima "Klenow fragment", a qual possui atividade de exonuclease 3'→5'.

#### **6.2.6. Comparação do clone de 1,4 kb *Bgl II / Bgl II* com sequências do banco de dados**

Análise da sequência de DNA do fragmento 1,4 kb *Bgl II / Bgl II* revelou a presença de quatro "open reading frames": uma de 84 bp, uma *orf* incompleta de 121 bp, uma *orf* de 354 bp (*orf118*) e uma *orf* de 344 bp (*orf116*). A comparação destas quatro *orfs*

com sequências presentes no banco de dados, através do programa BLAST, revelou elevada similaridade destas *orfs* com sequências do DNAm<sub>t</sub> de trigo e milho (Gualberto et al., 1988), as quais codificam o tRNA-Ser (homólogo aos 84 pb), um pseudo-tRNA (homólogo a *orf* incompleta de 121 pb), a subunidade 3 do complexo NADH-desidrogenase (*nad3*-homólogo a *orf118*) e a proteína ribossômica mitocondrial S12 (*rps12*-homólogo a *orf116*). Verificou-se, através da comparação da sequência deste último gene com a sequência homóloga presente em outros organismos, que ele estava incompleto no fragmento 1,4 kb *Bgl II / Bgl II* clonado do DNAm<sub>t</sub> de coix. Para obter a porção final do gene, o "cluster" *nad3-rps12* foi amplificado a partir do DNAm<sub>t</sub> de coix, clonado e sequenciado. A sequência da *orf116* completa possuía, na realidade, 375 bp (*orf125*). Encontrou-se uma alta similaridade entre as *orfs* identificadas no fragmento 1,4 kb *Bgl II / Bgl II* de coix, e as sequências que codificam o "cluster" *nad3-rps12* e o tRNA<sup>Ser</sup> presentes no DNAm<sub>t</sub> de muitos outros organismos. Assumiu-se, portanto, que os 84 pb, a *orf* incompleta de 121 pb, a *orf118* e a *orf125*, presentes no fragmento 1,4 kb *Bgl II / Bgl II* do DNAm<sub>t</sub> de coix, codificam, respectivamente, os genes tRNA-Ser, um pseudo-tRNA, *nad3* e *rps12*. A sequência completa do clone 1,4 kb *Bgl II / Bgl II*, com os genes em destaque, é apresentada na **Figura 13**. A posição dos subclones em relação aos genes encontrados no clone é apresentada na **Figura 14**.

A sequência de bases do gene *nad3* de coix mostrou 100% e 99,7% de similaridade com as sequências correlacionadas presentes, respectivamente, em milho e trigo. A similaridade de sequência de bases entre o gene *rps12* de coix e o mesmo gene presente em milho e trigo, respectivamente, é de 99,4% e 100%. A extensão da região intergênica existente entre *nad3* e *rps12* é de 44 bp, exatamente o mesmo tamanho da região espaçadora existente entre estes genes em milho e trigo (Gualberto et al., 1988). O

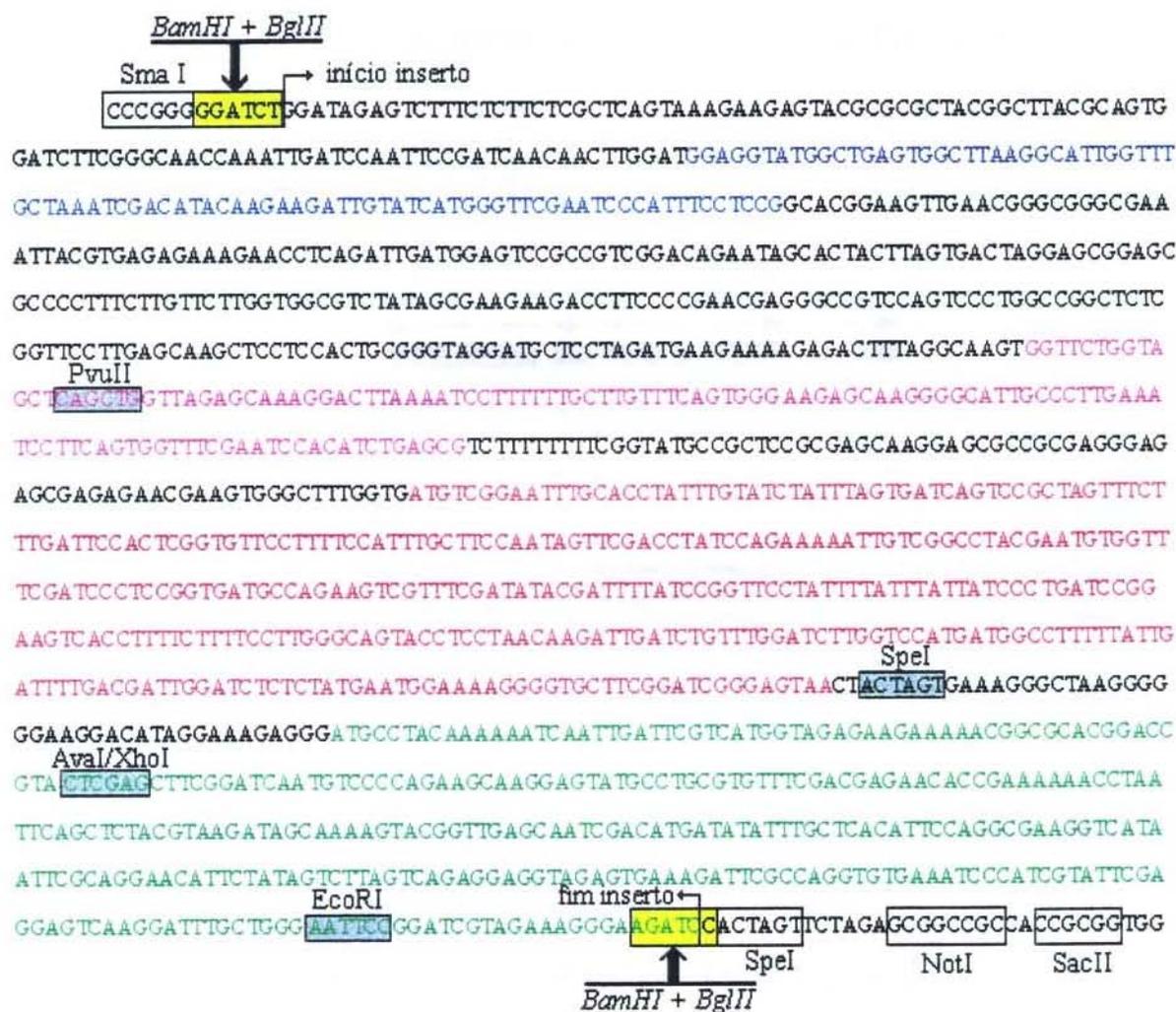
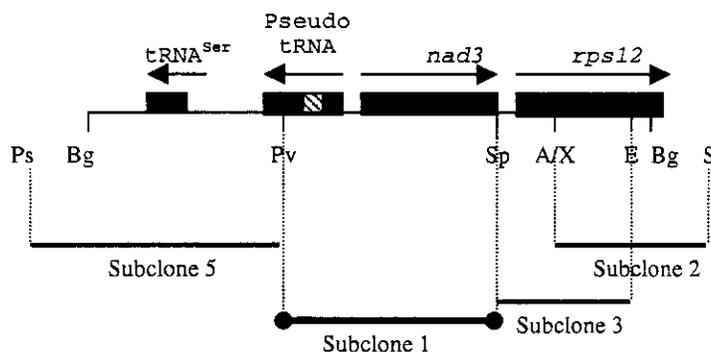


Figura 13: Sequência completa do fragmento 1,4 kb *Bgl* II / *Bgl* II. Estão indicados os sítios de restrição presentes no “polylinker” do vetor, próximos ao sítio de clonagem (*Bam* HI). Também estão indicados os sítios de restrição presentes no inserto. A sequência do tRNA<sup>Ser</sup> está em azul, do pseudo tRNA em rosa, do *nad3* em vermelho, e do *rps12* em verde.



▨ inserção de 48 pb

Figura 14: Mapa de restrição do fragmento 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*. Os genes estão representados por retângulos pretos, e a inserção de 48 pb do pseudo tRNA, por um retângulo hachurado. As regiões cobertas pelos subclones também estão indicadas. A região homóloga a *orf167* é a que corresponde ao subclone 1. A direção de transcrição está indicada por setas. Os sítios de restrição indicados são: *Ava I* (A), *Bgl II* (B), *Eco RI* (E), *Pst I* (Ps), *Pvu II* (Pv), *Sst I* (S), *Spe I* (Sp), *Xho I* (X). Os sítios *Pst I* e *Sst I* estão presentes no “polilynker” do plasmídeo pBluescript.

alinhamento dos genes *nad3* e *rps12*, presentes no DNAmT de coix, milho, trigo, petunia e tabaco, mostrou que existe elevada similaridade entre as sequências (**Figura 15**).

O gene tRNA<sup>Ser</sup>, presente em coix, é 100% similar, a nível de bases, aos genes presente em milho, trigo (Gualberto et al., 1988) e arroz (Suzuki et al., 1991). A sequência homóloga ao pseudo-tRNA existente no genoma mitocondrial de milho (Wintz et al., 1988), trigo (Gualberto et al., 1988) e arroz (Suzuki et al., 1991) foi encontrada, no DNAmT de coix, 258 bp após o gene tRNA<sup>Ser</sup>. Este pseudo-gene, em coix, possui uma inserção de 48 pb, exatamente como aquela existente no pseudo-gene de milho. Esta inserção em coix é 99% similar a inserção em milho.

#### **6.2.7. Clonagem da *orf 167* de *M. polymorpha***

Uma vez tendo sido confirmado que a *orf 167* havia, por algum motivo, reconhecido um fragmento do DNAmT de coix que possuía os genes *nad3-rps12*, o gene para tRNA<sup>Ser</sup> e a sequência de um pseudo-tRNA (mais especificamente, a *orf* se hibridizou com a região do fragmento contendo os genes *nad3* e uma porção do pseudo-tRNA, **Figura 14**), restou a dúvida do porque que ela se hibridizou com esta região, dado que, na briófitas, a *orf167* reconhecidamente não corresponde ao gene *nad3* ou a um pseudo-tRNA.

Elaborou-se a hipótese de que a região amplificada do DNA total de *M. polymorpha* com o qual se trabalhou no projeto pudesse não ter sido a equivalente à *orf167*. Por algum motivo, o fragmento amplificado, mesmo possuindo o tamanho exato previsto, poderia ser um produto de amplificação não específica. Entretanto, o produto de amplificação, quando migrado em gel de agarose, não apresentava rastro indicando amplificação não específica, e somente uma banda do tamanho esperado foi visualizada.

```

nad3milho      ATGTCGGAAATTGCACCTATTTGTATCTATTTAGTGTACAGTCCGCTAGTTTCCTTTGATT
nad3trigo      ATGTCGGAAATTGCACCTATTTGTATCTATTTAGTGTACAGTCCGCTAGTTTCCTTTGATT
nad3coix       ATGTCGGAAATTGCACCTATTTGTATCTATTTAGTGTACAGTCCGCTAGTTTCCTTTGATT
nad3petuni     ATGTCAGAAATTGCACCTATTTGTATCTATTTAGTGTACAGTCCGCTAGTTTCCTTTGATT
nad3tabaco     ATGTCAGAAATTGCACCTATTTGTATCTATTTAGTGTACAGTCCGCTAGTTTCCTTTGATT
*****
nad3milho      CCACTCGGTGTTCCCTTTTCCATTTGCTTCCAATAGTTCGACCTATCCAGAAAAATTTGTGG
nad3trigo      CCACTCGGTGTTCCCTTTTCCATTTGCTTCCAATAGTTCGACCTATCCAGAAAAATTTGTGG
nad3coix       CCACTCGGTGTTCCCTTTTCCATTTGCTTCCAATAGTTCGACCTATCCAGAAAAATTTGTGG
nad3petuni     CCACTCGGTGTTCCCTTTTCCATTTGCTTCCAATAGTTCGACCTATCCAGAAAAATTTGTGG
nad3tabaco     CCACTCGGTGTTCCCTTTTCCATTTGCTTCCAATAGTTCGACCTATCCAGAAAAATTTGTGG
*****
nad3milho      GCCTACGAATGTGGTTCGGATCCCTCCGGTGTATGCCAGAAGTCGTTTCGATATAGGATTT
nad3trigo      GCCTACGAATGTGGTTCGGATCCCTCCGGTGTATGCCAGAAGTCGTTTCGATATAGGATTT
nad3coix       GCCTACGAATGTGGTTCGGATCCCTCCGGTGTATGCCAGAAGTCGTTTCGATATAGGATTT
nad3petuni     GCCTACGAATGTGGTTCGGATCCCTCCGGTGTATGCCAGAAGTCGTTTCGATATAGGATTT
nad3tabaco     GCCTACGAATGTGGTTCGGATCCCTCCGGTGTATGCCAGAAGTCGTTTCGATATAGGATTT
*****
nad3milho      TATCCGGTTCCTATTTTATTTATTCCTGACCCGGAAGTCACCTTTTCCTTTCCCTGG
nad3trigo      TATCCGGTTCCTATTTTATTTATTCCTGACCCGGAAGTCACCTTTTCCTTTCCCTGG
nad3coix       TATCCGGTTCCTATTTTATTTATTCCTGACCCGGAAGTCACCTTTTCCTTTCCCTGG
nad3petuni     TATCCGGTTCCTATTTTATTTATTCCTGACCCGGAAGTCACCTTTTCCTTTCCCTGG
nad3tabaco     TATCCGGTTCCTATTTTATTTATTCCTGACCCGGAAGTCACCTTTTCCTTTCCCTGG
****
nad3milho      GGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATCTGTTTGGATCTGGGCCATGATGGGCTTTTATTT
nad3trigo      GGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATCTGTTTGGATCTGGGCCATGATGGGCTTTTATTT
nad3coix       GGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATCTGTTTGGATCTGGGCCATGATGGGCTTTTATTT
nad3petuni     GGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATCTGTTTGGATCTGGGCCATGATGGGCTTTTATTT
nad3tabaco     GGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATCTGTTTGGATCTGGGCCATGATGGGCTTTTATTT
*****
nad3milho      GATTTTGACGATTGGATCTCTCTATGAATGGAAAAGGGGTGCTTCGGATCGGGAGTAACC
nad3trigo      GATTTTGACGATTGGATCTCTCTATGAATGGAAAAGGGGTGCTTCGGATCGGGAGTAACC
nad3coix       GATTTTGACGATTGGATCTCTCTATGAATGGAAAAGGGGTGCTTCGGATCGGGAGTAACC
nad3petuni     GATTTTGACGATTGGATCTCTCTATGAATGGAAAAGGGGTGCTTCGGATCGGGAGTAACC
nad3tabaco     GATTTTGACGATTGGATCTCTCTATGAATGGAAAAGGGGTGCTTCGGATCGGGAGTAACC
*****
rps12milho     ACTAGTGAAGGGGTAAG---GGGGGAAGGACATAGGAAAGAGGGATGCTACAAAAAAT
rps12trigo     ACTTAGAAAGGGCAAG---GGGGGAAGGACATAGGAAAGAGGGATGCTACAAAAAAT
rps12coix      ACTAGTGAAGGGGTAAG---GGGGGAAGGACATAGGAAAGAGGGATGCTACAAAAAAT
rps12petuni    ACTAGTGAAGGGGCAAAAAATAGGGGAAGGACAAAGGAAGAGC-ATGCCATCACTAAAT
rps12tabaco    ACTAGTGAAGGGGCAAAAAATGGGGG---
****
rps12milho     CAATTGATTCGTCTAGGTAGAGAGAAAAAGGGCAGGACCGTACTCGAGCTTCGGAT
rps12trigo     CAATTGATTCGTCTAGGTAGAGAGAAAAAGGGCAGGACCGTACTCGAGCTTCGGAT
rps12coix      CAATTGATTCGTCTAGGTAGAGAGAAAAAGGGCAGGACCGTACTCGAGCTTCGGAT
rps12petuni    CAATTGATTCGTCTAGGTAGAGAGAAAAAGGGCAGGACCGTACTCGAGCTTCGGAT
rps12tabaco    CAATTGATTCGTCTAGGTAGAGAGAAAAAGGGCAGGACCGTACTCGAGCTTCGGAT
*****
rps12milho     TCAATGTCCCCAGAAGCAAGGAGTATGCCCTGGTGTTCGACGAGAACCCGAAAAAACC
rps12trigo     TCAATGTCCCCAGAAGCAAGGAGTATGCCCTGGTGTTCGACGAGAACCCGAAAAAACC
rps12coix      TCAATGTCCCCAGAAGCAAGGAGTATGCCCTGGTGTTCGACGAGAACCCGAAAAAACC
rps12petuni    TCAATGTCCCCAGAAGCAAGGAGTATGCCCTGGTGTTCGACGAGAACCCGAAAAAACC
rps12tabaco    TCAATGTCCCCAGAAGCAAGGAGTATGCCCTGGTGTTCGACGAGAACCCGAAAAAACC
*****
rps12milho     TAATTCAGCTCTACGTAAGATAGCAAAAGTACGGTTGAGCAATCGACATGATATTTGC
rps12trigo     TAATTCAGCTCTACGTAAGATAGCAAAAGTACGGTTGAGCAATCGACATGATATTTGC
rps12coix      TAATTCAGCTCTACGTAAGATAGCAAAAGTACGGTTGAGCAATCGACATGATATTTGC
rps12petuni    TAATTCAGCTCTACGTAAGATAGCAAAAGTACGGTTGAGCAATCGACATGATATTTGC
rps12tabaco    TAATTCAGCTCTACGTAAGATAGCAAAAGTACGGTTGAGCAATCGACATGATATTTGC
*****
rps12milho     TCACATTCAGGGCGAAGGTCAATAATTCGAGGAACATTCATAGTCTTAGTCAGAGGGGG
rps12trigo     TCACATTCAGGGCGAAGGTCAATAATTCGAGGAACATTCATAGTCTTAGTCAGAGGGGG
rps12coix      TCACATTCAGGGCGAAGGTCAATAATTCGAGGAACATTCATAGTCTTAGTCAGAGGGGG
rps12petuni    TCACATTCAGGGCGAAGGTCAATAATTCGAGGAACATTCATAGTCTTAGTCAGAGGGGG
rps12tabaco    TCACATTCAGGGCGAAGGTCAATAATTCGAGGAACATTCATAGTCTTAGTCAGAGGGGG
*****
rps12milho     TAGAGTGAAGATTCCGCAAGGTGAAATCCCATCGTATTCGAGGAGTAAAGGATTTGCT
rps12trigo     TAGAGTGAAGATTCCGCAAGGTGAAATCCCATCGTATTCGAGGAGTCAAGGATTTGCT
rps12coix      TAGAGTGAAGATTCCGCAAGGTGAAATCCCATCGTATTCGAGGAGTCAAGGATTTGCT
rps12petuni    TAGAGTGAAGATTCCGCAAGGTGAAATCCCATCGTATTCGAGGAGTCAAGGATTTGCT
rps12tabaco    TAGAGTGAAGATTCCGCAAGGTGAAATCCCATCGTATTCGAGGAGTCAAGGATTTGCT
*****
rps12milho     GGGAAATCCGGATCGTAGAAAGGGGAGATCTAAATATGGCCGAGAAAGCCAAAATCTA
rps12trigo     GGGAAATCCGGATCGTAGAAAGGGGAGATCTAAATATGGCCGAGAAAGCCAAAATCTA
rps12coix      GGGAAATCCGGATCGTAGAAAGGGGAGATCTAAATATGGCCGAGAAAGCCAAAATCTA
rps12petuni    GGGAAATCCGGATCGTAGAAAGGGGAGATCTAAATATGGCCGAGAAAGCCAAAATCTA
rps12tabaco    GGGAAATCCGGATCGTAGAAAGGGGAGATCTAAATATGGCCGAGAAAGCCAAAATCTA
*****
rps12milho     AATGA
rps12trigo     AATGA
rps12coix      AATGA
rps12petuni    TATGA
rps12tabaco    -----
****

```

nad3

rps12

Figura 15: Alinhamento entre as sequências dos genes *nad3* e *rps12* do DNAmT de coix, milho, trigo, petunia e tabaco. A identidade de bases entre as quatro sequências é indicada por um asterisco.

---

Mesmo assim a sequência dos oligonucleotídeos foi novamente verificada, constatando-se que estavam corretas.

O passo seguinte foi a clonagem do fragmento amplificado, seu sequenciamento e comparação com a sequência da *orf167* presente nos bancos de dados, para confirmar se o fragmento clonado correspondia, de fato, à *orf167* de *M. polymorpha*. Uma série de testes foram feitos para se ter certeza de que o fragmento amplificado, clonado e sequenciado seria o mesmo que foi utilizado em todos os experimentos até então. Verificou-se que ambos fragmentos, se tratavam da mesma sequência amplificada.

Após sequenciamento do clone e alinhamento da sequência obtida com a sequência da *orf167* presente no banco de dados, concluí-se que o fragmento amplificado e clonado foi a *orf167* de *M. polymorpha*.

O alinhamento da sequência da *orf167* com a região do clone de 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II*, que é reconhecida na hibridização, e corresponde ao subclone 1, indica que existem regiões de homologia dispersas entre as duas sequências. Estas regiões foram suficientes para promoverem hibridização nas condições de estringência utilizadas, ou seja, hibridização com 50% de similaridade entre a sonda e o DNA imobilizado na membrana (**Figura 16 A**).

No entanto, pode-se observar na **Figura 16 B**, que não há homologia a nível de aminoácido entre o polipeptídeo predito a partir de cada uma das sequências, indicando que elas não codificam a mesma proteína.

A

```

orf clone 1,4 kb -----GTTACTTCTT
CCCGAACGAGGGCCGTCAGTCCCTGGCCGGCTCTCGGTTCCCTTGAGCAAGCTCCTCCAC
* * * * *

orf clone 1,4 kb TTGCGGCTGTTTTCTTAAAATACAGCGAAAGGATTTGGATATATGTCGATGAAGTACATT
TGCCGGTAGGATGCTCCTAGATGAAGAAAAGAGACTTTAGGCAAGTGGTTCTGGTAGCTC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb AACTAATCGGATCGTGCG-CGTGGCAAATTCCTTGGGAGGGTTTGTCTGGAGCATG-G
AGCTGGTTAGAGCAAAGGACTTAAAATCCTTTTTTGTCTGTTTCAGTGGGGAAGAGCAAG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb GGTCTTCATCAAACAAGCGCTTATGTGATTTAGGTTCTCACGACATAACTTGTTTTCTTC
GGGCATTGCCCTTGAATCCTTCAGTGGTTTCAATC-CACATCTGAGCGTCTTTTTTTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb TGATAGACTAGGACAATGTATCTCAGGGTCTCTCATTATTTCCGTAGCATCCTGGTCAGG
CGGTATGCC-GCTCCGCGAGCAAGGAGCGCCGCGAGGGAGAGCGAGAGAACAAGTGGGC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb CATAGAAAGAGCCCACTTCGCTATCTCACTTATCTCCTCGGCCAGTGGTCC-----
TTTGGTATGTCGGAATTTGCACCTATTTGTATCTATTTAGTGATCAGTCCGCTAGTTTC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb CATGAATAGACCATGCTCTTCTTTGATAAGGAATTTCTTAAGATGGAC-----AGC
TTTGATTCACCTCGGTGTTCTTTCCATTTGCTTCCAATAGTTCGACCTATCCAGAAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb ATCATGAGCTGGAAAGACTATCATTCTTCTCGCTAGAGCT-CCTGAAGTC--TCTGACAT
ATTGTCGGCCTACGAATGTGGTTTCGATCCCTCCGGTGATGCCAGAAGTCGTTTCGATAT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb ACCGAGATATTCATTACCTACGATGAGTACCCAACCTGAATAGCTGAATTCATGTCTTAC
ACGATTTTATCCGGTTCCTATTTTATTTATATCCCGTATCCGGAAGTCACCTTTTCTT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb ATTTGCATGTTTTAGTTTACACGAAATCCTATCTCCTCCAAC-----
TTTCTTGGGCAGTACCTCCTAACAAAGATTGATCTGTTTGGATCTTGGTCCATGATGGCCT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf clone 1,4 kb -----
TTTTATTGATTTTGACGATTGGATCTCTCTATGAATGGAAAAGGGGTGCTTCGGATCGGG
-----

orf clone 1,4 kb -----
AGTAACTACTAGTGAAAGGGCTAAGGGGGGAAGGACATAGGAAAGAGGGATGCCTACAAA
-----

```

B

```

orf167 MLI VVNDSPFYKGD TAILRQLVGGDRISCKLKHANVRHEFSYSGWVLIVGNEYLGMSSETS
nad3coix -----MLEFAP-----IC IYLVISLLVFLILLGVPFLFASNSSTYPEKLSAYECGFDPFG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf167 GALARRMIVFPARNAVHLKFLIKEEHGLFMGPLAEEISEIAKWALSMPDQDATEIMRDP
nad3coix DARSRFDIRFYL-----VSILFIIF-DLEVTFFFPWAVSL---NKIDLFG--
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

orf167 EIHCPSLSEENKLCRENLNHISACL MKTPCSSSKPSQGICHAHPIS
nad3coix -----FWSMMAFLLLILTIGFLYEWKRGALDWE-----
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 16 A: Alinhamento entre a sequência da *orf167* amplificada a partir do DNA total de *M. polymorpha*, e as sequências do pseudo-tRNA (azul) e *nad3* (vermelho). B: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos do gene *nad3* de coix e a sequência do polipeptídeo deduzido a partir da *orf167*. Os asteriscos correspondem a homologia de bases (A) e aminoácidos (B) entre as duas sequências.

### 6.2.8. Verificação se a *orf167* de *M. polymorpha* reconhece o gene *nad3* e o pseudo-tRNA no DNAm<sub>t</sub> de outras espécies vegetais

Hibridizou-se o DNAm<sub>t</sub> de alfafa, batata, coix, couve flor, ervilha, milho e soja, contidos na membrana 2Mp, com o gene *nad3* de trigo e o pseudo-tRNA de coix (**Figura 17**) com o intuito de verificar se a *orf167* reconhece estas sequências também em outras espécies vegetais além de coix. Utilizou-se o gene *nad3* de trigo devido ao fato dele estar clonado sem a sequência do pseudo-tRNA adjacente. O clone do gene *nad3*, originado do DNAm<sub>t</sub> de coix, possui o pseudo-tRNA ao lado. Como os genes *nad3* de coix e trigo apresentam 95% de similaridade, pode-se dizer que os resultados obtidos com o gene de trigo seriam idênticos àqueles que seriam obtidos com o gene de coix. O pseudo-tRNA foi obtido através da amplificação por PCR desta sequência a partir do subclone 1 (ver **Figura 10**)

A comparação do resultado da hibridização da membrana 2Mp com a *orf167*, com o gene *nad3* de trigo e o pseudo-tRNA, indicou que o gene *nad3* e o pseudo-tRNA reconheceram simultaneamente o mesmo fragmento que a *orf167* no DNAm<sub>t</sub> de coix e milho. A *orf167* reconheceu fracamente uma banda do DNAm<sub>t</sub> de ervilha que se hibridiza com o gene *nad3*, e uma banda do DNAm<sub>t</sub> de batata que reconhece o pseudo-tRNA. Muito provavelmente a banda que a *orf167* reconheceu no DNAm<sub>t</sub> de batata possui de fato o tRNA<sup>Phe</sup>, o qual é muito similar ao pseudo-tRNA (**Figura 28**). Entretanto, nas outras espécies, a *orf167* hibridizou à fragmentos que não possuem o gene *nad3* e nem o pseudo-tRNA (**Figura 17**).

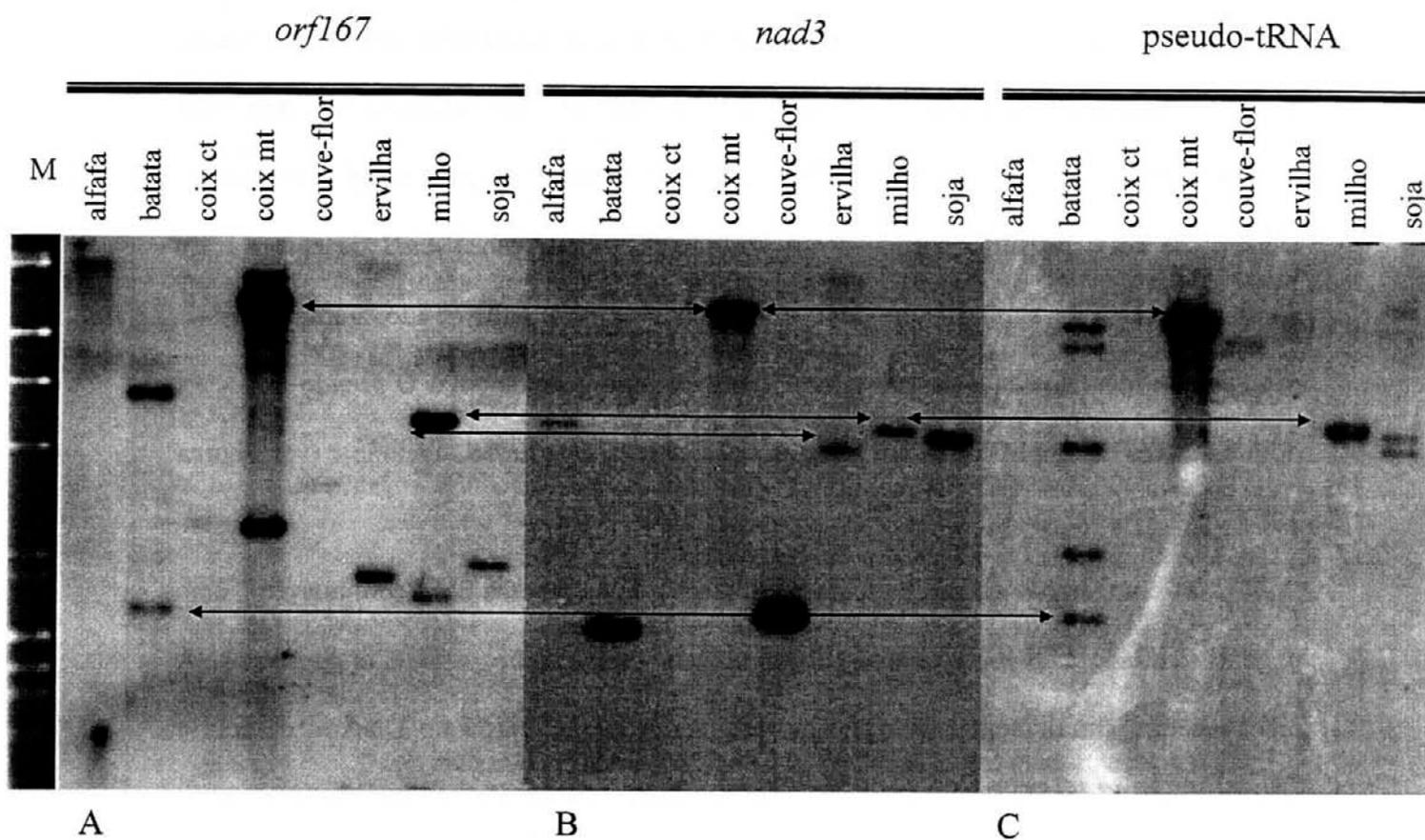


Figura 17: Resultado obtido após hibridização da *orf167* (A), do gene *nad3* de trigo (B) e do pseudo-tRNA (C) com a membrana 2Mp. As setas indicam bandas idênticas reconhecidas pelas duas sondas. M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X*Hae III*.

---

### 6.3. 3<sup>o</sup> ETAPA: Estudo da transcrição do fragmento do DNAm<sub>t</sub> de coix homólogo à *orf167* e de edição dos transcritos

#### 6.3.1. Estudo da transcrição dos genes presentes no fragmento de 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* do DNAm<sub>t</sub> de coix

Foram feitos testes de extração do RNAm<sub>t</sub> total com e sem Ácido Auriltricarboxílico (ATA), o qual funciona como protetor das moléculas de RNA.

Observou-se que o ATA diminuiu muito a degradação do RNA (**Figura 18**), passando, então, a ser utilizado nas extrações de RNAm<sub>t</sub> total, quando o emprego deste fosse a confecção de membranas com RNA. Sabe-se que RNA extraído com ATA não pode ser empregado para reações, de, por exemplo, síntese de cDNA. Portanto, para estes fins extraímos o RNA total sem o protetor ATA.

Membranas contendo o RNAm<sub>t</sub> total de coix, milho, batata e coix foram preparadas conforme descrito no item **5.10.2**.

A qualidade do RNAm<sub>t</sub> extraído de cada uma das 4 espécies, bem como a qualidade das membranas, foi verificada através de hibridizações das mesmas com o gene que codifica a subunidade  $\alpha$  da porção  $F_1$  do complexo ATP sintetase (ATP- $\alpha$ ) (**Figura 19**). O resultado indicou que, tanto as membranas, quanto o RNAm<sub>t</sub> de coix, milho e couve-flor estavam com boa qualidade. Houve problema com o RNAm<sub>t</sub> total de batata, o qual, por algum motivo, não foi transferido.

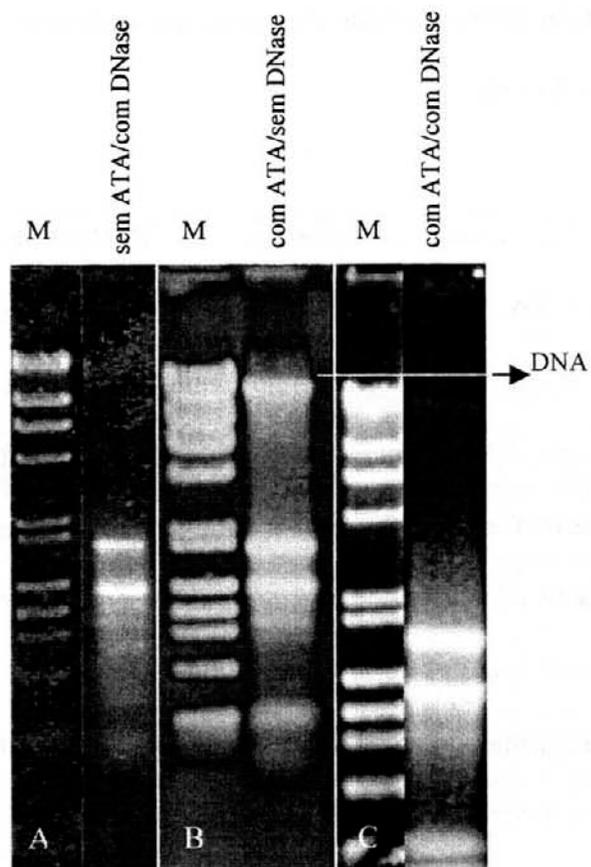


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose do RNAm<sub>t</sub> total de coix extraído sem ATA (A), com ATA, antes do tratamento com DNase (B), e com ATA, após o tratamento com DNase (C). M: marcador de peso molecular  $\lambda$ *Hind III* /  $\phi$ X*Hae III*.

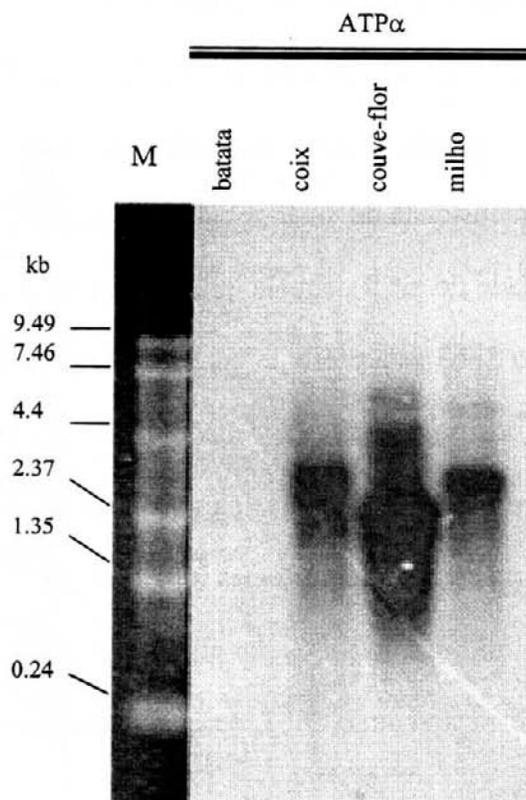


Figura 19: Hibridização do gene da proteína ATP- $\alpha$ , usado como controle, com a membrana que contém o RNAm total de batata, coix, couve-flor e milho. M: marcador de peso molecular “0.24 - 9.5 kb RNA Ladder”.

Os subclones Sub1, Sub2 e Sub3 e Sub5 foram hibridizados com o RNA total de coix para o estudo de suas transcrições. Os subclones Sub3 e Sub4 possuem unicamente o gene *rps12*, e o Sub5 possui o gene para tRNA<sup>Ser</sup> (**Figura 14**).

Os subclones 1, 2 e 3 se hibridizaram a transcritos do RNAm<sub>t</sub> total de mesmo tamanho (**Figura 20**). Provavelmente, os três fragmentos hibridizaram-se ao mesmo transcrito. Curiosamente a intensidade do sinal gerado pela banda que se hibridizou com o Sub2 é maior que a intensidade do sinal daquela que se hibridizou com o Sub3. Tal fato é estranho pois a sequência do Sub3 está presente no Sub2 (**Figura 10**). A medição da taxa de incorporação de nucleotídeos radioativos, feita durante a síntese das duas sondas, indicou que os valores foram muito semelhantes para as duas sondas, de modo que a taxa de incorporação não explicaria esta diferença. Duas hipóteses foram levantadas: a de que a membrana de RNA que se hibridizou ao Sub2, por algum motivo, possuía mais RNA que a membrana utilizada na hibridização com o Sub3, ou que houve inversão das sondas, e/ou membranas durante a hibridização.

Uma vez que o Sub1 possui o gene *nad3*, e os Sub2 e Sub3 possuem o gene *rps12*, e visto que estes subclones reconheceram o mesmo transcrito, concluiu-se que os genes *nad3* e *rps12* são cotranscritos (**Figura 20**).

Os subclones 1, 3 e 5, correspondendo respectivamente aos genes pseudo-tRNA-*nad3*, *rps12* e *trnS* (gene para tRNA<sup>Ser</sup>), foram utilizados para estudo de transcrição utilizando-se RNAm<sub>t</sub> de coix, couve-flor, batata e milho (**Figura 21**). Com exceção do RNAm<sub>t</sub> de batata, para o qual não houve sinal de hibridização (vide **Figura 19**), observou-se expressão dos genes analisados nas outras três espécies.

A hibridização do Sub1, que possui o gene *nad3* e parte do pseudo-tRNA, e do Sub3, que possui o gene *rps12*, revelou para ambos os subclones um mesmo transcrito de

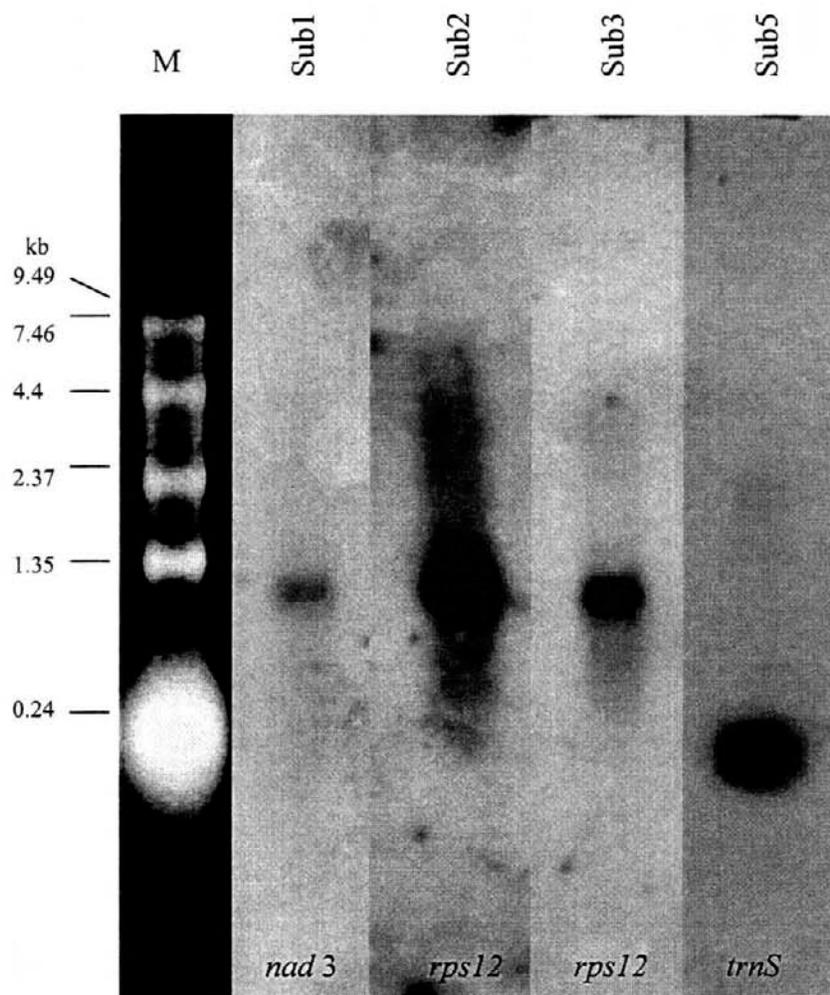


Figura 20: Hibridização dos subclones 1 (gene *nad3* e pseudo tRNA), 2 (gene *rps12*), 3 (gene *rps12*) e 5 (gene que codifica o tRNA<sup>Ser</sup>) com o RNAm total de coix. M: marcador de peso molecular “0.24 - 9.5 kb RNA Ladder”.

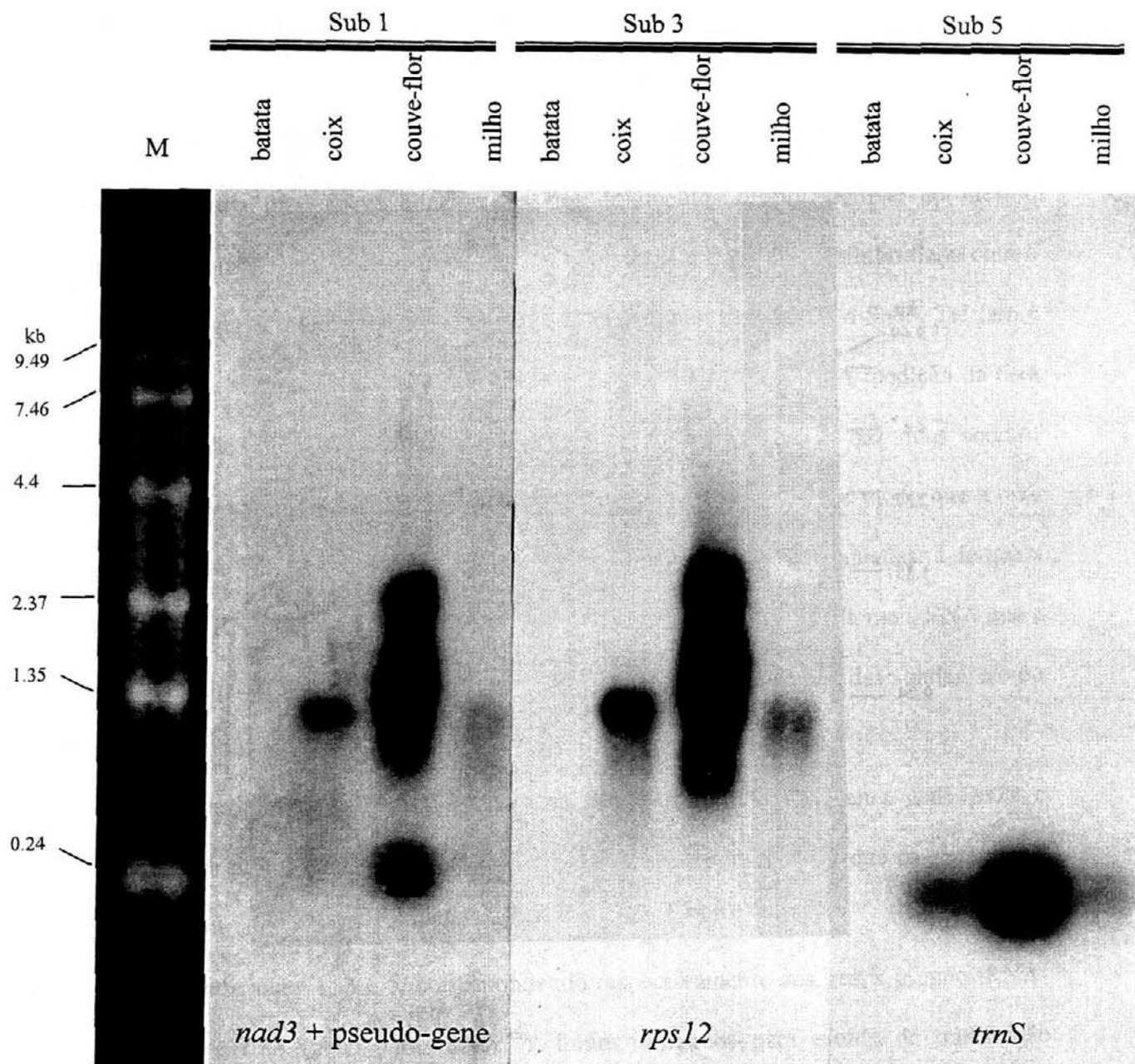


Figura 21: Hibridização do RNAm total de coix, milho, batata e couve-flor com o subclone 1 (gene *nad3*), subclone 3 (gene *rps12*) e subclone 5 (gene para tRNA<sup>Ser</sup>). M: marcador de peso molecular “0.24 - 9.5 kb RNA Ladder”.

1,3 kb em coix, um transcrito de 1 kb em milho, além de alguns transcritos entre 2,3 kb e 1 kb no DNAmT de couve-flor. Estes dados indicaram que os genes *nad3* e *rps12* são provavelmente cotranscritos em coix, milho e couve-flor.

Em couve-flor, a hibridização do Sub1 revelou um transcrito pequeno, de 200 pb, além do transcrito correspondente ao gene *nad3*. Levantou-se a hipótese de que este pequeno transcrito seria devido ou à transcrição do pseudo-tRNA, ou à existência de um verdadeiro tRNA, homólogo ao pseudo-tRNA, transcrito. Para verificar estas suposições hibridizou-se o RNAmT total de couve-flor com somente o pseudo-tRNA e somente o gene *nad3*. A hibridização com o pseudo-tRNA não reconheceu nenhuma banda em duas tentativas. Entretanto a hibridização com somente o gene *nad3*, diferentemente do resultado obtido com a hibridização com o Sub1, não revelou a banda de cerca de 200 pb. Estes resultados põe em dúvida se este pequeno fragmento identificado está relacionado com o pseudo-tRNA, assim como ao processamento do transcrito do gene *nad3* (o qual não se sabe se é realmente cotranscrito com o *rps12* em couve-flor). Uma outra hipótese levantada é a de que o produto identificado na hibridização do Sub1 com a amostra de RNAmT de couve-flor presente naquela membrana seria originado da hibridização do gene *nad3* com um produto de degradação do transcrito deste gene, presente naquela amostra.

O tRNA-Ser (presente no Sub5) é transcrito nas 3 espécies analisadas, resultando em uma molécula de RNA de 200 pb.

### **6.3.2. Síntese e análise de cDNAs dos genes *nad3* e *rps12* de coix**

A posição dos oligonucleotídeos desenhados, a sequência deles bem como as temperaturas de anelamento são apresentadas na **Figura 22**.

A

5`

1 GGATCTGGAT AGAGTCTTTC TCTTCTCGCT CAGTAAAGAA GAGTACGCGC tRNAs<sup>er</sup>

51 GCTACGGCTT ACGCAGTGGG TCTTCGGGCA ACCAAATTGA TCCAATTCCG

101 ATCAACAAC TGGATGGAGG TATGGCTGAG TGGCTTAAGG CATTGGTTTG

151 CTAAATCGAC ATACAAGAAG ATTGTATCAT GGGTTCGAAT CCCATTTCTT

201 CCGGCACGGA AGTTGAACGG GCGGGCGAAA TTACGTGAGA GAAAGAACCT

251 CAGATTGATG GAGTCCGCCG TCGGACAGAA TAGCACTACT TAGTGACTAG

301 GAGCGGAGCG CCCCTTTCTT GTTCTTGGTG GCGTCTATAG CGAAGAAGAC

351 CTTCCCCGAA CGAGGGCCGT CCAGTCCCTG GCCGGCTCTC GGTTCCCTGA Pseudo tRNA

400 GCAAGCTCCT CCACTGCGGG TAGGATGCTC CTAGATGAAG AAAAGAGACT

451 TTAGGCAAGT GGTTCTGGTA GCTCAGCTGG TTAGAGCAA GGACTTAAAA

501 TCCTTTTTTG CTTGTTTCAG TGGGAAGAGC AAGGGGCATT GCCCTTGAAA

551 TCCTTCAGTG GTTTCGAATC CACATCTGAG CGTCTTTTTT TTCGGTATGC Oligo fnad3

601 CGCTCCGCGA GCAAGGAGCG CCGCGAGGGA **GAGCGAGAGA ACGAAGTGGG**

651 **CTTTGGTGAT GTCGGAATT** GCACCTATTT STATCTATTT AGTGATCAGT Oligo dnad3

701 CCGCTAGTTT CTTTGATTCC ACTCGGTGTT CCTTTTCCAT TTGCTTCCAA

751 TAGTTCGACC TATCCAGAAA AATTGTCCGGC CTACGAATGT GGTTTCGATC

3`GCCACT ACGGTCTTCA GC 5` ← Oligo map5` Nad3

801 CCTCCGGTGA TGCCAGAAGT CGTTTCGATA TACGATTTTA TCCGGTTCCT

851 ATTTTATTTA TTATCCCTGA TCCGGAAGTC ACCTTTTCTT TTCCTTGGGC

901 AGTACCTCCT AACAAGATTG ATCTGTTTGG ATCTTGGTCC ATGATGGCCT

951 TTTTATTGAT TTTGACGATT GGATCTCTCT ATGAATGGAA AAGGGGTGCT

1001 TCGGATCGGG AGTAACTACT AGTGAAAGGG CTAAGGGGGG AAGGACATAG

1051 GAAAGAGGGA TGCCTACAAA AAATCAATTG ATTCGTCATG GTAGAGAAGA Rps12

1101 AAAACGGCGC ACGGACCGTA CTCGAGCTTC GGATCAATGT CCCAGAAGC

1151 AAGGAGTATG CCTGCGTGTT TCGACGAGAA CACCGAAAAA ACCTAATTCA

1201 GCTCTACGTA AGATAGCAAA AGTACGGTTG AGCAATCGAC ATGATATATT

1251 TGCTCACATT CCAGGCGAAG GTCATAATTC GCAGGAACAT TCTATAGTCT

1301 TAGTCAGAGG AGGTAGAGTG AAAGATTCGC CAGGTGTGAA ATCCCATCGT

1351 ATTCGAGGAG TCAAGGATTT GCTGGGAATT CCGGATCGTA GAAAGGGAAG

1401 ATC 3`

## B

```

5`
1295  ATGCCTACAA AAAATCAATT GATTCGTCAT GGTAGAGAAG AAAAACGGCG
1345  CACGGACCGT ACTCGAGCTT CGGATCAATG TCCCCAGAAG CAAGGAGTAT
1395  GCCTGCGTGT TTCGACGAGA ACACCGAAAA AACCTAATTC AGCTCTACGT
1445  AAGATAGCAA AAGTACGGTT GAGCAATCGA CATGATATAT TTGCTCACAT
1495  TCCAGGCGAA GGTCATAATT CGCAGGAACA TTCTATAGTC TTAGTCAGAG
1545  GGGGTAGAGT GAAAGATTTCG CCAGGTGTGA AATCCCATCG TATTCGAGGA
1595  GTAAAGGATT TGCTGGGAAT TCCGGATCGT AGAAAGGGAA GATCTAAATA
          ←
          3`GATTTACTTA CTTTCTACGG AG 5` ←
1645  TGGCGCAGAA AGACCAAAT CTAAATGAAT GGAAGATGCC TCTGAACTTA
          ←
          3`CGAAG GAAAGGGAAT ←
1695  TTGTTATTT TGGGGGGGCG ATATGGAAGC AGCTAGGCTTC CTTCCCTTA
          AATGC 5`
1745  TTACGTTACC AGCCCACCGC TATTCCAAAA ACCTTAGCTT CATATGGCTC
1795  CTCTATGATC AGGTTCTCAA AAGAATTTCC TTCCTTGAA AAACCAAGGA
1845  CAACCCCTAT CTCAGTCTCC TTTCTCTTTT GGGAGCAGAG CTGAGCTTCA
1895  AAGTTTAGAG TAACTATGAG ATGAGATTTAG 3`

```

Oligo drps12

Oligo frps12

Figura 22 A: Sequência de nucleotídeos do fragmento 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* do DNAmT de coix. A sequência dos oligonucleotídeos, utilizados para a confecção e amplificação do cDNA, está sublinhada. B: Sequência de nucleotídeos do gene *rps12* de milho obtida do banco de dados (o número de acesso é X14709). Utilizou-se a porção final deste gene para se definir a sequência dos oligos frps12 e drps12.

Somente o oligonucleotídeo frps12 não funcionou em nenhuma das condições testadas. Ele foi desenhado a partir da sequência de milho, partindo-se da suposição de que a região 3', logo após o "stop" do gene *rps12* em milho, seria tão conservada em coix, como o é a região codificadora deste mesmo gene. Aparentemente este não é o caso pois não conseguiu-se amplificação do DNAmT de coix com este oligonucleotídeo.

#### 6.3.2.1. Sequenciamento da porção final do gene *rps12*

Analisando-se a **Figura 14** pode-se ver que o clone 1,4 kb *Bgl II* / *Bgl II* não possui a parte final do gene *rps12*, de modo que se procurou conhecer esta porção através da amplificação do "cluster" *nad3-rps12*, utilizando-se um oligonucleotídeo posicionado na região 3' do gene *rps12*. Este oligonucleotídeo, denominado drps12, foi desenhado baseado na sequência conhecida da porção deste gene, em milho e trigo.

Após clonagem do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos fnad3 e drps12, a partir do DNAmT de coix, e transformação de bactérias *E. coli*, analisou-se seis colônias transformadas. Verificou-se que cinco delas possuíam o inserto correto de 800 pb. Os clones foram sequenciados revelando a porção final do gene *rps12* (**Figura 23**).

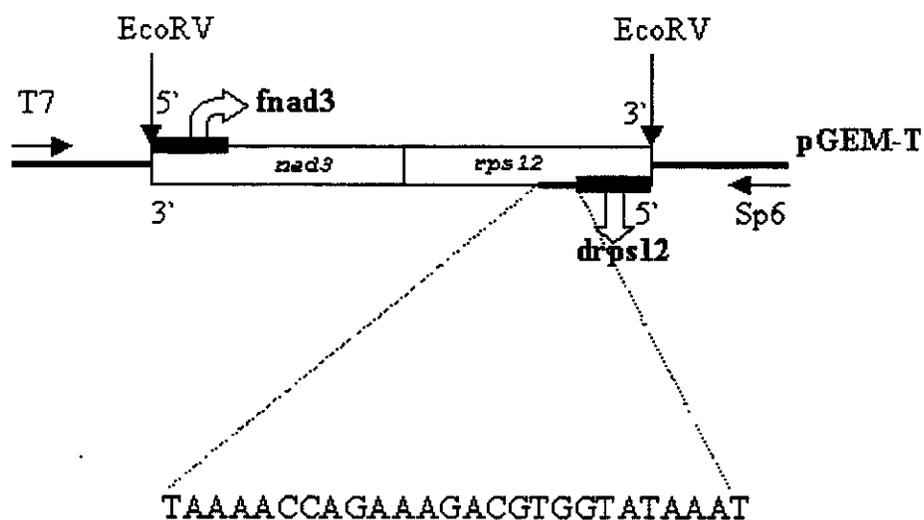


Figura 23: Esquema de um clone formado pela ligação do plasmídeo pGEM-T com os genes *nad3-rps12* amplificados a partir do DNAmT de coix. O sequenciamento deste clone com o oligonucleotídeo Sp6 revelou a porção final do gene *rps12*.

### 6.3.2.2. Síntese dos cDNA, clonagem e sequenciamento

#### 6.3.2.2.1. cDNA do "cluster" *nad3-rps12* obtido pela combinação dos oligonucleotídeos *fnad3/drps12* e *dnad3/drps12*

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o oligonucleotídeo *drps12*. Fez-se dois lotes de cDNA com este oligonucleotídeo. O cDNA obtido foi amplificado por PCR utilizando-se as combinações *fnad3/drps12* e *dnad3/drps12*.

Após amplificação por PCR migrou-se 50 µl do produto de amplificação em gel de agarose, isolou-se a banda, e purificou-se o DNA. Em seguida o DNA foi ligado ao plasmídeo pGEM-T, e introduzido em *E. coli* linhagem DH5α. Os cDNA foram denominados de 1 a 4 de acordo com os oligonucleotídeos utilizados para sua amplificação/confecção e o lote de cDNA empregado (**Figura 24**). O resultado obtido com a amplificação confirmou a cotranscrição dos genes *nad3* e *rps12*.

Foram sequenciados 23 clones de cDNA do "cluster" *nad3-rps12*. As sequências obtidas foram alinhadas com a sequência do DNA genômico, buscando eventos de troca de citidina, as quais estão presente na sequência de DNA, para uracila, presentes no mRNA, e, conseqüentemente, timidina no cDNA. Este evento de troca é conhecido como edição e afeta quase todos os mRNA mitocondriais estudados até agora. Encontrou-se 21 eventos de edição no gene *nad3*, e 8 eventos no gene *rps12*. Alguns codons possuem dois sítios de edição, de modo que existem 29 sítios editados no "cluster" gênico, mas apenas 25 codons são alterados. Os sítios de edição, encontrados no "cluster" *nad3-rps12*, são apresentados na **Figura 25**.

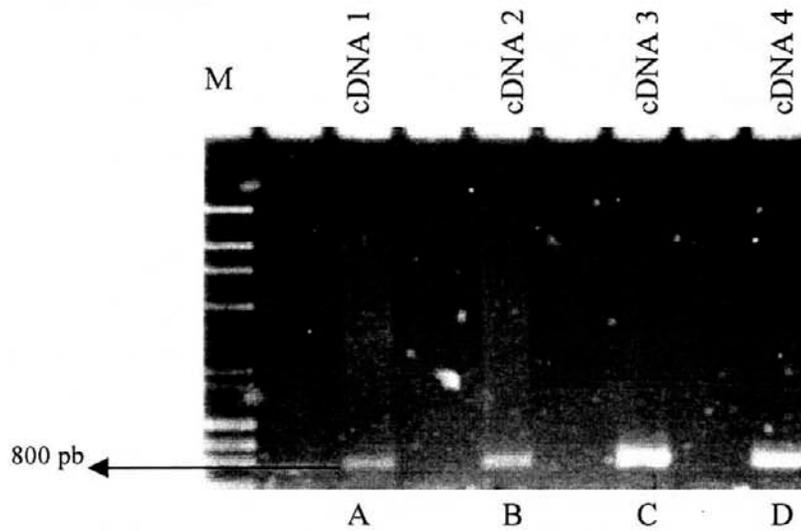


Figura 24: cDNA amplificado por PCR e migrado em gel de agarose. A) cDNA 1 (dnad3/drps12, lote 1); B) cDNA 2 (dnad3/drps12, lote 2); C) cDNA 3 (fnad3/drps12, lote 1); D) cDNA 4 (fnad3/drps12, lote 2). M: marcador  $\lambda$ Hind III /  $\phi$ XHae III.

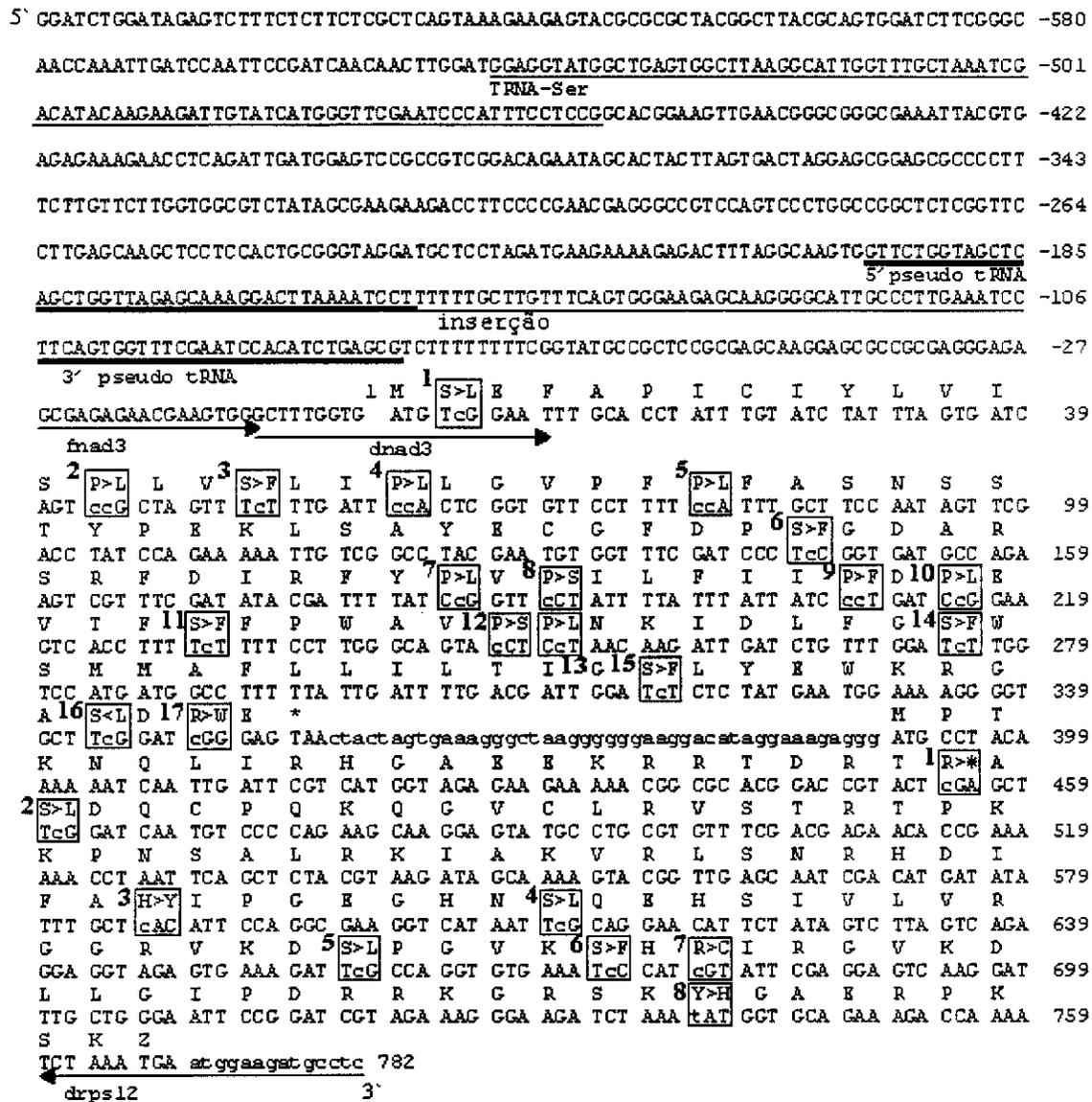


Figura 25: Sequência de nucleotídeos do loco *trnS*/pseudo-tRNA/*nad3*/*rps12* presente no DNAmT de coix. A sequência de amoniácidos é dada acima da sequência genômica. Os codons alterados pela edição do mRNA, e as correspondentes alterações dos aminoácidos codificados, estão dentro de retângulos numerados. Os nucleotídeos alterados são apresentados por letras minúsculas. As posições dos oligonucleotídeos usados para a síntese dos cDNAs e/ou ampliações por PCR estão indicados por setas.

Todos os eventos de edição detectados resultaram em mudança de aminoácido, isto é, não foi observado nenhum caso de edição silenciosa. Edição silenciosa corresponde a edição em uma base do codon, que não leva a uma alteração do aminoácido especificado por ele. Ela ocorre sempre na segunda ou terceira base do codon. Vinte e duas alterações de codons devido a edição, em um ou dois sítios, aumentaram a similaridade da sequência de aminoácidos das proteínas NAD3 e RPS12 de coix, às sequências das mesmas proteínas de outros organismos. No gene *nad3*, foram dezesseis as alterações de codons que resultaram em aminoácidos conservados durante a evolução, correspondendo a 13,5% do total de resíduos codificados. No gene *rps12*, encontrou-se seis alterações levando a aminoácidos conservados entre diferentes espécies de plantas, o que determinou 4,8% do total de resíduos codificados.

Observou-se que três alterações de codons, uma no gene *nad3*, e duas no gene *rps12*, são espécie-específicas e determinam mudanças não conservativas, isto é, aminoácidos diferentes daqueles conservados evolutivamente. Estas alterações ocorreram no sítio de edição 4 (presente no 3º codon alterado) do gene *nad3*, e nos sítios 1 e 8 (presentes nos 1º e 8º codons alterados) do gene *rps12*. Estes eventos de edição foram considerados raros, pois foram detectados somente em um clone entre os 23 analisados.

Estes sítios determinaram mudanças de S-para-F (sítio 4 do gene *nad3*), de R-para-codon "stop" (sítio 1 do gene *rps12*) e Y-para-H (sítio 8 do gene *rps12*). No sítio de edição 8 do gene *rps12* ocorre uma troca U-para-C, diferentemente de todos os outros sítios de edição. Este tipo de edição é difícil de ser encontrado no RNAm de plantas, havendo poucos casos já relatados.

A análise da quantidade de sítios editados, em cada cDNA sequenciado, revelou que existem cDNAs não editados e cDNAs parcialmente editados, refletindo a presença de

transcritos com diferentes graus de edição na mitocôndria. Desconsiderando-se as três edições raras e não conservativas, os resultados obtidos mostraram que, aproximadamente, 26% dos transcritos do gene *nad3* estavam completamente editados, 44% estavam extensivamente editados, 17% estavam pouco editadas e 13% estavam completamente não editados (**Figura 26**). O gene *rps12* apresentou 53% dos transcritos completamente editados, 17% extensivamente editados, 17% pouco editados e 13%, não editados. É interessante notar que mais de cinquenta por cento dos transcritos *nad3-rps12* possuem todos os sítios editados na porção correspondente ao gene *rps12*, enquanto que somente a metade deste grupo apresenta todos os sítios do gene *nad3* já editados. Estes resultados sugeriram que o gene *rps12* é primeiramente ou mais rapidamente editado que o gene *nad3*.

#### **6.3.2.2.2. Mapeamento da região 5' do transcrito dos genes *nad3-rps12***

Como se observou um único transcrito de 1,3 kb do "cluster" *nad3-rps12*, não havendo moléculas maiores ou menores, sugere-se que este transcrito seja o resultado de um processamento muito rápido, não sendo possível, portanto, observar-se transcritos primários. Este transcrito poderia sofrer novo processamento rápido após o término da transcrição, impossibilitando a detecção de transcritos intermediários. O conhecimento do sítio de início da transcrição e dos sítios de processamento é importante para o conhecimento do processo de transcrição dos genes mitocondriais de plantas.

Para poder-se conhecer a região 5' do mRNA utilizou-se a estratégia conhecida como RACE ("Rapid Amplification of cDNA Ends"). Esta técnica permite conhecer o sítio

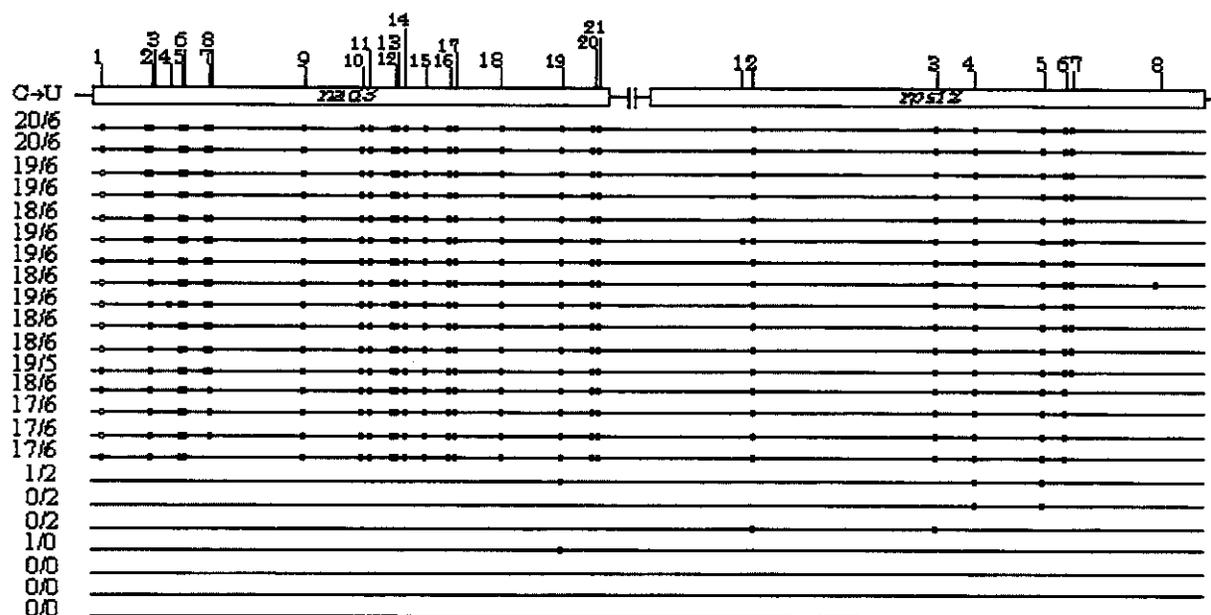


Figura 26: Representação do loco mitocondrial *nad3-rps12* e da localização dos sítios de edição encontrados nos 23 clones de cDNA sequenciados. Os sítios de edição estão indicados nos genes *nad3* e *rps12*. Na posição correspondente a cada sítio de edição, um ponto indica que houve edição no clone de cDNA sequenciado. Um círculo vazio indica que não se conhece a situação de edição do sítio no cDNA. Ao lado do esquema dos clones está indicado quantos sítios foram editados de C para U no gene *nad3*, primeiro e no gene *rps12*, depois.

de início da transcrição do mRNA, ou de processamento da molécula precursora, na região 5' não traduzida.

Para a síntese da região 5' não traduzida do gene *nad3*, desenhou-se um oligonucleotídeo, denominado o map5', cuja sequência permite seu anelamento próximo a extremidade 5' do gene *nad3* (Figura 22). Adicionou-se uma cauda homopolimérica (composta de adenina ou guanina) na extremidade 3' do cDNA sintetizado, de modo que o fragmento pudesse ser amplificado por PCR através de anelamento de oligonucleotídeo com cauda homopolimérica compatível.

O cDNA sintetizado foi amplificado, originando uma banda de 700 pb. Este fragmento foi clonado, e analisou-se 12 colônias transformadas contendo o inserto vindo do lote 3, e 13 colônias com o inserto vindo do lote 4. Após extração dos plasmídeos, eles foram digeridos com *Sst I* e *Sst II* para liberação do inserto, e com *Pvu II*, para se conferir a identidade do inserto. Os resultados da digestão não mostraram as bandas esperadas. Mesmo assim, vários destes clones foram sequenciados com os oligonucleotídeos T7 e Sp6. Nas sequências obtidas foi possível identificar o oligonucleotídeo map5', porém a sequência adjacente não era aquela do gene *nad3*. O sequenciamento a partir da outra extremidade dos clones revelou a presença da cauda poli-T, após a qual não havia a sequência esperada, ou seja, aquela presente na região 5' do gene *nad3* (Figura 27). Esta figura ilustra o sucesso da técnica no sentido de viabilizar a confecção do cDNA com o oligonucleotídeo map5' e sua amplificação em conjunto com os oligonucleotídeos com cauda poli-T.

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa BLAST, e os resultados indicaram que o cDNA clonado correspondia a uma porção do gene rRNA mitocondrial

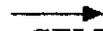
**T7**  
  
**pGEM T** **oligonucleotídeo 1/2 cauda poliT**  
TCGCTGCTCCGGCCGCATGGCNGCGGGATTCTCGAGCTCTGCAGTTTTTTTT  
TTTTTTTTTTTTTTTAAGGCGCGCCCTCGGGGCGCCGCGCTGCAACGGCCTGCG  
AGCTCCCATCCGACCCGTCTTGAAACA CGGACCAAGGGAGTCTGACATGCGT  
GCGAGTCGACGGGTTCTAAAACCTGGGGATGCGCAAGGGAAGCTGACTAGCGG  
GGAGGCCTTCACGGGCCGCAACCGCTGGCCGACCCTGATCTTCTGTGAAGGGTTC  
GAGTTGGAGCACGCCTGTCGGGACCCGAAAGATGGTGA ACTATGCCTGAGCGG  
GGCGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGGAGGCTCGAAGCGATACTGACGTGCAA  
ATCGTTCGTCTGACTTGGGTATAGGGGCGAAAAGACTAATCGAACCATCTAGT  
NGCTGGTTCCTCCGAAAGTTTCCCTCAGGATAGCTGGAGCCCATTACGAGTTC  
TATCGGGTTAAAGCCAATGATTANAGGCTCGGGGGCGCAACGCCCTCGACCT  
ATTCTCAA ACTTTAAATAGGTTAGGAA CGGCCCGGCT

Figura 27: Sequência de um dos clones do cDNA sintetizado com o iniciador map5', adicionado de cauda poli-A e amplificado por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos 1 e 2 com cauda poli-T (vide Tabela 1).

26S, devido a elevada similaridade observada com o rRNA mitocondrial 26S de várias espécies.

O fato de todos os clones analisados apresentarem o cDNA do rRNA 26S, e não o cDNA correspondente a porção 5' do transcrito do "cluster" *nad3-rps12*, indicou que o oligonucleotídeo map5' foi capaz de se anelar a uma região de baixa similaridade presente no rRNA 26S, provavelmente devido a baixa temperatura usada para a síntese do cDNA (42° C). A T<sub>m</sub> do oligonucleotídeo é 61°C. A baixa temperatura utilizada permitiu a síntese de cDNA inespecífico, o qual foi amplificado posteriormente, na reação de amplificação, uma vez que esta também utiliza baixa temperatura de anelamento (50°C). Esta baixa temperatura é devido ao uso dos oligonucleotídeos com cauda T. Provavelmente o cDNA correto também foi sintetizado, porém a amplificação dele não ocorreu devido às condições de anelamento da reação de amplificação do cDNA favorecerem o anelamento inespecífico. Além disto o fato do rRNA estar representado em muito maior porcentagem no RNAm total, do que o mRNA dos genes *nad3-rps12*, provavelmente fez com que um número muito maior de moléculas de cDNA do rRNA fossem sintetizadas.

Em contrapartida, o sucesso obtido na amplificação, a partir do cDNA sintetizado com o oligonucleotídeo drps12, do "cluster" *nad3-rps12* se deveu, muito provavelmente, às condições altamente seletivas da amplificação, a qual utilizou dois oligonucleotídeos gene-específicos, tendo sido possível, então, utilizar-se suas T<sub>m</sub> adequadas.

A reação de síntese do cDNA com o oligonucleotídeo map5' foi repetida, empregando-se uma temperatura mais alta (55°C). Entretanto, mesmo a esta temperatura, o oligonucleotídeo se anelou ao transcrito ribossômico, e este foi novamente amplificado.

Um novo experimento foi realizado utilizando-se o cDNA confeccionado com o oligonucleotídeo drps12 para o mapeamento da região 5'. Adicionou-se uma cauda poli-A

---

ao cDNA, e este foi utilizado nas reações de amplificação empregando-se o protocolo de amplificação com "Hot Start" (item 5.8.2.2). Como controle, amplificou-se o cDNA utilizando-se os oligonucleotídeos drps12 e dnad3, para verificar-se a integridade do cDNA após reação de adição de cauda poli-A. O controle amplificou o fragmento de 800 pb esperado. A reação com os oligonucleotídeos drps12 e oligonucleotídeos 1 e 2 (com cauda poli-T), produziu uma banda de 200 pb. Após clonagem e sequenciamento deste fragmento, verificou-se que ele era um dímero entre os oligonucleotídeos. Mesmo os aumentos da temperatura de anelamento para 55°C e 60°C, continuou a possibilitar a formação dos dímeros, no primeiro caso, e não possibilitou a amplificação de nenhum fragmento, no segundo caso. A temperatura de 60°C foi, provavelmente, muito elevada para o anelamento dos oligonucleotídeos 1 e 2. A conclusão tirada foi a de que algum problema ocorreu na purificação do cDNA, que fez com que os oligonucleotídeos não fossem eliminados. Assim, os oligonucleotídeos acabaram por receber uma cauda poli-A, e foram, preferencialmente, amplificados. Desta forma, não foi possível sintetizar-se o cDNA correspondente à região 5' não traduzida do gene *nad3*.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Existe alguma correlação entre a *orf167* e o gene *nad3*?

A *orf167* foi descrita por Oda et al., (1992) como uma proteína hipotética de 18,6 kDa, codificada na região intergênica *nad3-nad7* do genoma mitocondrial da briófito *M. polymorpha*. Quando a *orf167* foi empregada como sonda em hibridização com estringência média, a qual permitia a hibridização de fragmentos com 50% de similaridade, ela reconheceu um fragmento do DNAm<sub>t</sub> de coix de 1,4 kb. O mapeamento dos sítios de restrição deste fragmento, e a identificação da região exata de homologia à *orf167*, revelaram que tal região correspondia a 0,5 kb do fragmento inteiro e estava delimitada pelos sítios *Pvu II* e *Spe I*. Após subclonagem (Sub1) e sequenciamento do fragmento de 0,5 kb *Spe I / Pvu II*, identificou-se que ele apresentava a sequência de um pseudo-tRNA e o gene *nad3*. O alinhamento entre a sequência deste subclone com *orf167*, revelou que havia uma similaridade de 40-50% entre as bases das duas sequências (Figura 16A). A confirmação experimental desta similaridade foi realizada hibridizando-se o DNAm<sub>t</sub> de alfafa, batata, coix, couve flor, ervilha, milho e soja com o gene *nad3* de trigo e a sequência do pseudo-tRNA de coix (Figura 17). Utilizou-se o gene *nad3* de trigo devido ao fato dele estar clonado sem a sequência do pseudo-tRNA adjacente. O clone do gene *nad3*, originado do DNAm<sub>t</sub> de coix, possui o pseudo-tRNA ao lado. Como os genes *nad3* de coix e trigo apresentam 95% de similaridade, pode-se dizer que os resultados obtidos com o gene de trigo seriam idênticos àqueles que seriam obtidos com o gene de coix.

A comparação do resultado da hibridização da membrana 2Mp com a *orf167*, com o gene *nad3* de trigo e com o pseudo-tRNA de coix indicou que o gene *nad3* e o pseudo-

tRNA reconheceram o mesmo fragmento que a *orf167* no DNAm<sub>t</sub> de coix (banda de cerca de 20 kb) e milho (banda de cerca de 6 kb). A *orf167* reconheceu fracamente uma banda do DNAm<sub>t</sub> de ervilha que se hibridiza com o gene *nad3*, e uma banda do DNAm<sub>t</sub> de batata que reconhece o pseudo-tRNA. Muito provavelmente a banda que a *orf167* reconheceu no DNAm<sub>t</sub> de batata possui de fato o tRNA<sup>Phe</sup>, o qual é muito similar ao pseudo-tRNA (Figura 28). Entretanto, nas outras espécies, a *orf167* se hibridizou à fragmentos que não possuem o gene *nad3* e nem o pseudo-tRNA (Figura 17).

O fato do gene *nad3* e do pseudo-tRNA de coix possuírem similaridade maior que 95% ao gene *nad3* e ao pseudo-tRNA de milho explica porque a *orf167* se hibridizou ao gene *nad3* e ao pseudo-tRNA de coix e de milho, nas condições de estringência empregadas. As condições empregadas na hibridização heteróloga eram bastante sensíveis, e podiam resultar na presença de muitas bandas ou na ausência total de bandas, com pequenas alterações na temperatura ou concentração de sal. Neste sentido, nas condições empregadas, a *orf167* pôde se hibridizar com o gene *nad3* e o pseudo-tRNA do DNAm<sub>t</sub> de coix e milho, cujas sequências são muito similares, mas não pôde reconhecer o gene *nad3* e o pseudo-tRNA no DNAm<sub>t</sub> das outras espécies. É interessante ressaltar que o resultado autoradiográfico obtido da hibridização da *orf167* com a membrana contendo o DNAm<sub>t</sub> das várias espécies vegetais, apresentado na Figura 17, resulta de lavagem da membrana, após hibridização, à 50 °C. Uma lavagem a 52 °C foi feita e o resultado mostrou a permanência, na autoradiografia, de somente a banda de cerca de 20 kb do DNAm<sub>t</sub> de coix e a banda de cerca de 6 kb do DNAm<sub>t</sub> de milho. Este resultado indicou que estas bandas possuíam uma similaridade maior à *orf167* que as demais bandas, um indicativo forte de que poderiam possuir sequências semelhantes entre si.

Em alfafa, batata, coix, soja, milho e ervilha existem bandas que se hibridizam com a *orf167*, mas não correspondem ao gene *nad3* e ao pseudo-tRNA (**Figura 17**). Não se sabe a que correspondem estas bandas. O reconhecimento delas podem ser o produto de uma ligação inespecífica da *orf167*, de modo que cada uma pode corresponder a uma sequência, gene ou não, diferente.

A comparação entre a sequência do gene *nad3* e a da *orf167* indicou que as bases idênticas estão espalhadas ao longo da sequência, não formando regiões ou domínios de maior similaridade. Além disto observou-se, através da hibridização da membrana 2Mp com o gene *nad3*, que a associação *nad3-orf167* não é conservada em todas as espécies estudadas. Portanto parece provável que a *orf167* reconheceu, com a hibridização heteróloga, a sequência do pseudo-gene do DNAm<sub>t</sub> de coix e a do gene *nad3*, do DNAm<sub>t</sub> de coix e milho, devido à similaridade de sequência dispersa ao longo do fragmento. Embora não se possa descartar uma possível correlação evolutiva entre o gene *nad3* e a *orf167*, os resultados não apoiam esta hipótese. Entretanto é ainda bastante intrigante o fato da *orf167* estar localizada próxima do gene *nad3* no genoma mitocondrial de *Marchantia polymorpha* (vide **Figura 3**).

## **7.2. A conservação do loco tRNA<sup>Ser</sup>/pseudo-tRNA/*nad3/rps12* entre monocotiledôneas**

Investigações do genoma mitocondrial de plantas superiores demonstram que o conteúdo e a organização de seus genes pode diferir, mesmo entre espécies estreitamente relacionadas. Transferências recentes de sequências mitocondriais para o genoma nuclear

podem responder por parte desta variação, entre os diferentes genomas mitocondriais de plantas superiores (Brennicke et al., 1993).

Neste trabalho identificou-se os genes *nad3* e *rps12* do DNAmT de coix, os quais estão organizados em um "cluster" gênico, onde o gene *nad3* corresponde ao primeiro gene transcrito do "cluster". Esta mesma organização gênica já foi encontrada no genoma mitocondrial de várias outras espécies vegetais, como em trigo e milho (Gualberto et al., 1988), *Allium cepa*, *Helianthus annuus* e *Magnolia* spp (Perrotta et al., 1996), *Lupinus mutabilis* (Rurek et al., 1998), *Sorghum bicolor* (Howad e Kempken, 1997), petunia (Rasmussen e Hanson, 1989), *Panax ginseng* (Kim et al., 1991), *Brassica napus* (Itani e Handa, 1998), *Arabidopsis thaliana* (Grohmann et al., 1993) e outras. Em *Oenothera* sp (Grohmann et al., 1992), somente uma pequena porção do gene *rps12* ainda está presente no genoma mitocondrial, sendo cotranscrita com o gene *nad3*, enquanto que o gene funcional foi transportado para o genoma nuclear. Na solanácea *Nicotiana sylvestris*, encontrou-se a *orf87* e o gene *nad3* em duas regiões diferentes do genoma mitocondrial. Uma das regiões apresenta a organização *orf87-nad3-rps12*, enquanto que na outra região a organização é *orf87-nad3-nad1/A*, onde *nad1/A* significa exon A do gene *nad1* (Gutierrez et al., 1997). A presença de uma unidade *nad3-rps12* foi também confirmada em várias espécies de Gimnospermas (Karpinska et al., 1995). Análises de expressão gênica e sequenciamento de clones de cDNA revelaram que os dois genes são cotranscritos em coix, e em todas as espécies vegetais nas quais sabe-se que esta unidade está presente. Em *Nicotiana sylvestris* os genes *nad3*, *nad1/A* e *rps12* são exclusivamente transcritos em um mRNA policistrônico. O mesmo foi verificado para os genes *nad3* e *rps12* em trigo (Gualberto et al., 1991) e para a *orf25* e o gene *cox3* em arroz (Liu et al., 1992), assim como para os genes *rrn18* e *rrn5* em milho (Mulligan et al., 1988). Entretanto, a maturação

pós-transcricional dos transcritos primários codificados no "cluster" gênico *nad3-rps12* parece diferir entre as espécies. De fato, em *N. sylvestris*, transcritos contendo os genes *nad3* e *rps12* podem ser produzidos, uma vez que um sítio de processamento foi detectado na região intergênica. Entretanto, na mitocôndria de trigo, detectou-se apenas transcritos dicistrônicos contendo *nad3-rps12*. Além disto não se encontrou nenhum sítio de processamento na região intergênica (Gualberto et al., 1988). Uma vez que a região intergênica presente entre os genes *nad3* e *rps12* de trigo é muito similar (91%) à mesma região presente no cotranscrito *nad3-rps12* de coix, e não existem transcritos menores que 1,3 kb em coix, acredita-se que, em coix, assim como em trigo, os cotranscritos *nad3-rps12* não são processados para transcritos menores.

A ligação *nad3-rps12* é filogeneticamente conservada na mitocôndria das espermatófitas, mas não nas briófitas. Nas briófitas, os genes que codificam proteínas ribossômicas estão organizados em "clusters". Entretanto, as frequentes recombinações entre sequências repetidas específicas, observadas em quase todos os genomas mitocondriais de plantas superiores, dispersaram os genes que codificam proteínas ribossomais, e determinaram novas associações destes com outros genes. Considerando-se as frequentes recombinações no DNAm<sup>t</sup> de plantas superiores, pode-se sugerir que uma pressão seletiva específica deve ter atuado de forma a manter a associação entre genes envolvidos em complexos proteicos muito diferentes, como, por exemplo, os genes *nad3-rps12*.

A associação gênica tRNA<sup>Ser</sup>/pseudo-tRNA é outra associação conservada, encontrada no genoma mitocondrial de coix (este trabalho), milho, trigo (Gualberto et al., 1988) e arroz (Suzuki et al., 1991). Em coix, milho e trigo estes genes estão na região 5' do "cluster" *nad3-rps12*, porém, em arroz, eles foram encontrados na região 5' do gene *cox1*. A

organização diferente do loco tRNA<sup>Ser</sup>/pseudo-tRNA/*nad3/rps12* em arroz, indicou a ocorrência de um evento de recombinação na sequência imediatamente após o pseudo-tRNA.

O pseudo-tRNA, presente em arroz, parece ter evoluído a partir do tRNA<sup>Phe</sup>, uma vez que ele apresenta elevada similaridade a este gene (Suzuki et al., 1991). O alinhamento do pseudo-tRNA, descrito em milho, com aquele de coix e com o tRNA<sup>Phe</sup> de batata (Marechal-Drouard et al., 1993) revelou uma similaridade interessante. A sequência do tRNA<sup>Phe</sup> de batata pôde ser dividida em duas partes. A primeira parte é 95% similar à porção 5' do pseudo-tRNA gene de coix e milho, e a segunda parte é 88% similar à porção 3' do pseudo-tRNA destas espécies (**Figura 28**). Em milho, assim como em coix, parece que este pseudo-gene foi inativado durante a evolução, através da inserção de um segmento de 47 bp, em milho, e de 49 bp, em coix. Sugere-se, portanto, que este gene tenha evoluído a partir de uma sequência ancestral correspondente ao gene tRNA<sup>Phe</sup>. Curiosamente, em batata, o tRNA<sup>Phe</sup> está localizado após o gene tRNA<sup>Ser</sup>, e antes do gene tRNA<sup>Pro</sup>, formando, assim, o loco tRNA<sup>Ser</sup>/tRNA<sup>Phe</sup>/tRNA<sup>Pro</sup>.

Uma vez que o pseudo-tRNA não foi encontrado ainda nas dicotiledôneas, pode-se sugerir que ele foi formado após a divergência entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Provavelmente outro evento de recombinação, também após a divergência entre estes dois grupos, colocou o loco tRNA<sup>Ser</sup>/pseudo-tRNA na região 5' do "cluster" *nad3-rps12*, dado que a organização tRNA<sup>Ser</sup>/pseudogene/*nad3/rps12* foi encontrada somente em monocotiledôneas.

```

tRNA Phe      GTTCAGGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCAAAGGACTGAAAATCCTT-----
pseudo coix   GTTCTGGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCAAAGGACTTAAAATCCTTTTTTGCTTGTTCAGT
pseudo milho  GTTCTGGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCAAAGGACTTAAAATCCTTTTTTGCTTGTTCAGT
****
- região 5`
tRNA Phe      -----GTGTCAGTGGTT CGAATCCACTTCT
pseudo coix   GGGAA GAGC AAGGGGCATTGCCCTTGAAATCCTT----CAGTGGTT CGAATCCACATCT
pseudo milho  GGGAA GAGC AAGG--CATTGCCCTTGAAATCCTT----CAGTGGTT CGAATCCACATCT
*****
tRNA Phe      AAGCA
pseudo coix   GAGCG
pseudo milho  GAGCG região 3`
***

```

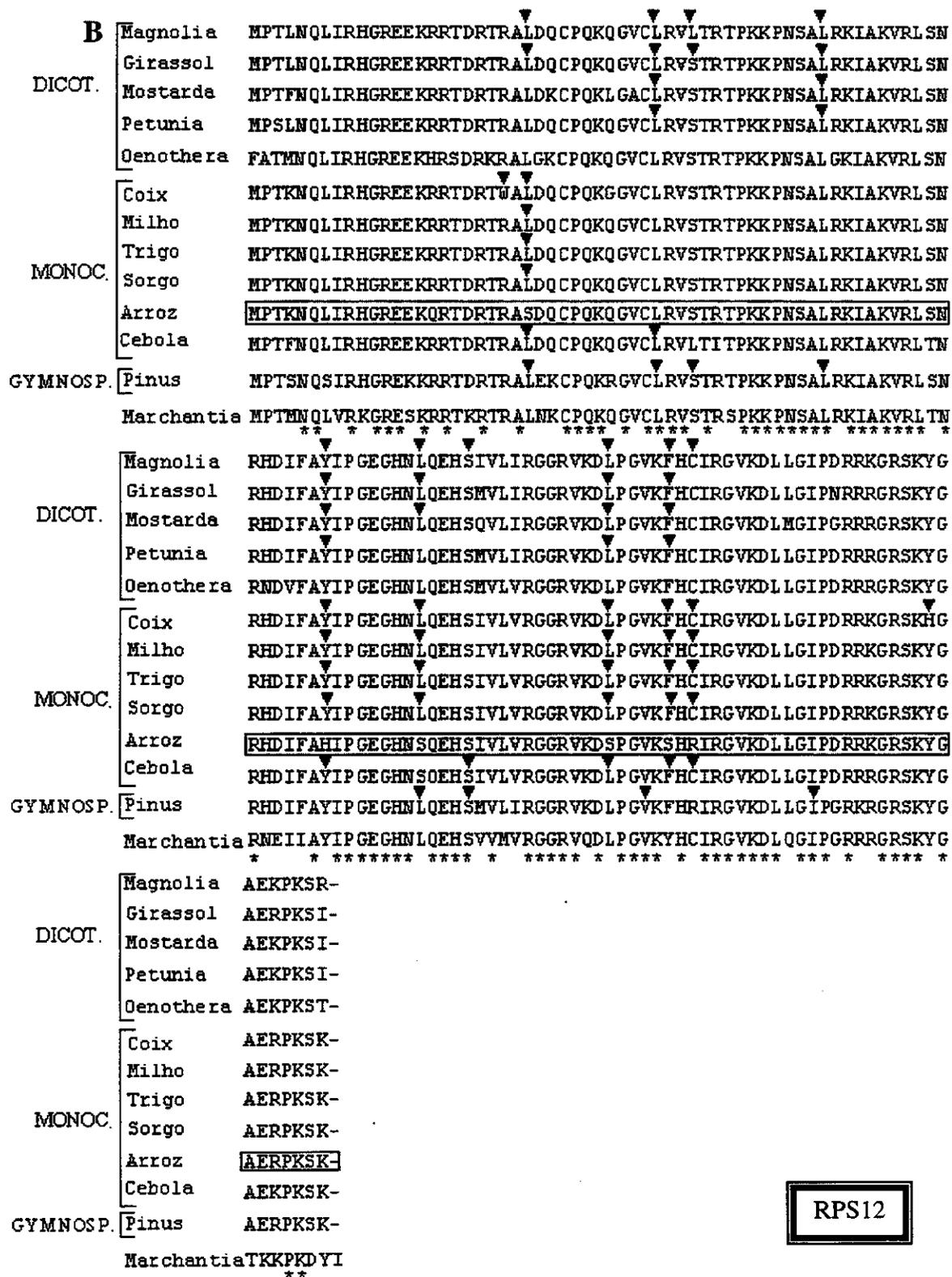
Figura 28: Alinhamento das seqüências de bases do pseudo-tRNA mitocondrial de coix e milho, com a seqüência do tRNA<sup>Phe</sup> de batata. Os asteriscos indicam identidade de nucleotídeo nas três seqüências.

### 7.3. Edição do mRNA dos genes *nad3* e *rps12* em plantas superiores

O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas NAD3 e RPS12 de *M. polymorpha* com aquelas presentes em uma espécie de Gimnosperma, e diferentes espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas permitiu-nos algumas conclusões sobre mudança do aminoácido especificado na sequência gênica via edição nos transcritos destes genes.

É interessante notar que a sequência de aminoácidos, predita a partir da sequência de bases dos genes *nad3* e *rps12* de mostarda (*Brassica napus*), corresponde à sequência de aminoácidos que se obtém após a edição de 50% dos sítios em outras espécies. O número de codons afetados por eventos de edição, silenciosos ou não, variou de 10 a 21 no gene *nad3*, e de 5 a 10 no gene *rps12*, entre as diferentes espécies analisadas (**Figura 29**). Em *Brassica napus*, há 10 códon modificados na sequência do genes *nad3*, e 6 codons no gene *rps12* (Itani e Handa, 1998). Os outros codons já encontram-se pré-editados na sequência genômica. Da mesma forma, os genes mitocondriais de rabanete (da família *Brassicaceae*) já examinados contém um número significativo de bases pré-editadas, quando comparados a outras dicotiledôneas (Rankin et al., 1996). Por outro lado, os transcritos *nad3-rps12* de *Magnolia* são os mais editados dentro do grupo das dicotiledôneas analisadas. Vinte e um codons são afetados pela edição no gene *nad3*, enquanto que dez codons são afetados no gene *rps12* (Perrotta et al., 1996). Este fato sugere que as *Magnoliales* ocupam uma posição ancestral dentro das Angiospermas (Cronquist, 1988). No grupo das dicotiledôneas, as espécies evolutivamente mais avançadas que *Magnolia* spp parecem ter uma acentuada tendência a perder, ao contrário de ganhar sítios de edição, para os genes *nad3-rps12* no decorrer da evolução (Perrotta et al., 1996).





RPS12

Figura 29: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas NAD3 (A) e RPS12 (B), as quais são afetadas por edições silenciais (indicados por setas brancas) e não-silenciais (indicadas por setas pretas), de diversas espécies de monocotiledôneas (MONOC), dicotiledôneas (DICOT), uma espécie de Gimnosperma e *Marchantia polymorpha*. Os asteriscos indicam identidade de aminoácidos em todas as seqüências alinhadas. A seqüência de aminoácidos dos genes NAD3 e RPS12 de arroz disposta dentro de um retângulo não teve a edição estudada (Suzuki et al., 1991). A seqüência de aminoácidos da proteína RPS12 de *Oenothera* corresponde à versão completa do gene *rps12* que está no núcleo. Os sítios de edição estão pré-editados na seqüência genômica (Grohmann et al., 1992).

Tem-se observado que o processo de edição geralmente é mais frequente nas Gimnospermas em relação às Angiospermas (Glaubitz e Carlson, 1992; Hiesel et al., 1994). Muitas diferenças entre os sítios editados são devido ao fato de que codons pré-editados já estão presentes na sequência genômica. De fato, os transcritos dos genes *nad3* e *rps12* são editados em 27 (23 codons afetados) e 8 (8 codons afetados) sítios, respectivamente, em *Pinus silvestris* (Karpinska et al., 1995).

Entre as monocotiledôneas foram observados 19 codons afetados pela edição (incluindo mudanças silenciosas) no gene *nad3* de cebola (Perrotta et al., 1996) e milho (Grosskopf e Mulligan, 1996), 17 no gene *nad3* de coix (este trabalho) e trigo (Gualberto et al., 1991), e 15 no gene *nad3* de sorgo (Howad e Kempken, 1997); no gene *rps12* verificou-se 8 codons modificados por edição em coix (este trabalho), 7 codons em cebola (Perrotta et al., 1996) e 6 codons em milho (Phreaner et al., 1996), trigo (Gualberto et al., 1991) e sorgo (Howad e Kempken, 1997). Estes mesmos valores para o grupo das dicotiledôneas são : no gene *nad3* ele varia de 21 codons alterados por edição, em *Magnolia* spp (Perrotta et al., 1996), a 9 codons em mostarda (Itani e Handa, 1998); no gene *rps12* a variação é entre 10 codons, em *Magnolia* spp (Perrotta et al., 1996) e 5 em petunia (Wilson e Hanson, 1996). Nas espécies de Angiospermas analisadas, a média de sítios de edição verificada foi de 16 codons alterados, no gene *nad3* e 7 codons alterados, no gene *rps12*.

A maioria dos eventos de edição detectados nos transcritos *nad3-rps12* de coix são também verificados em várias outras plantas, especificamente nas posições 115 e 117 da sequência de aminoácido, as quais estão conservadas em todas as plantas, incluindo as Gimnospermas, como pode ser visto na **Figura 29**. Estes eventos de edição parecem ter, portanto, uma origem filogenética comum, e talvez datam de antes da separação evolutiva entre as Angiospermas e as Gimnospermas.

Existem eventos de edição que resultam na conversão de um aminoácido conservado em outro menos conservado. Estes eventos geralmente são raros. Por exemplo, um deste eventos ocorre na posição 2456 da sequência de nucleotídeos do gene *rps12*, presente no DNAm de rabanete citoplasma Ogura. Encontrou-se edição neste sítio somente uma vez no lote de cDNAs analisados, e esta edição resultou na conversão de uma serina conservada para uma fenilalanina. Os autores (Rankin et al., 1996) não a consideraram como evento de edição por ter sido detectada somente uma vez. Seis potenciais novos sítios de edição foram identificados durante as análises de edição dos transcritos do gene *atp6* de *Sorghum bicolor*. Três são silenciosos e os outros três não o são. Cinco destes sítios ocorreram somente uma vez nos 51 clones analisados e, portanto, foram considerados como prováveis erros das enzimas Transcritase Reversa ou *Taq* polimerase. Entretanto discutiu-se se os eventos silenciosos ou os eventos raros, não silenciosos, não poderiam ser resultantes de uma baixa taxa de erro do sistema de edição em plantas superiores. Esta baixa taxa de erros poderiam ter alguns efeitos paralelos benéficos, como a introdução de mutações pontuais em um pequeno número de mRNA, os quais, quando traduzidos poderiam resultar em proteínas ATP6 com uma sequência de aminoácidos mais vantajosa para a sua atividade (Kempken et al., 1995). A posição 5 do gene *nad3* é editada somente em *Magnolia*, e em mais nenhuma outra espécie onde estes transcritos tenham sido estudados, sendo, portanto, um sítio de edição espécie-específico. Esta modificação determina uma mudança do codon alanina para um codon valina, sendo que o significado funcional deste evento não foi esclarecido. A similaridade química entre este dois resíduos pode fazer com que a troca de um pelo outro não cause nenhum efeito na funcionalidade da proteína. Discute-se também se este evento não poderia ser resultado de uma necessidade específica deste aminoácido, na proteína NAD3 presente na mitocôndria de *Magnolia* (Perrotta et al.,

1996). Outro exemplo é a não detecção de edição na posição 74 dos transcritos do gene *rps12* de cebola. Entretanto a ausência de edição nesta posição, na mitocôndria de cebola, leva à incorporação de uma aminoácido “errado” no polipeptídeo S12, uma vez que leucina é o aminoácido conservado nos genes homólogos (Perrotta et al., 1996).

Uma situação análoga a estas descritas no parágrafo acima foi descrita neste trabalho, em três posições de edição: uma no gene *nad3* (codon 18) e duas no gene *rps12* (codons 22 e 118) (**Figura 25**). Em dois casos, um resíduo de aminoácido, conservado evolutivamente, foi mudado para outro. Um resíduo de Ser foi editado para um de Phe (posição 18) na sequência do NAD3, e no RPS12 uma Tyr foi substituída por uma His (posição 118). Entretanto, no caso da alteração do codon 22 do gene *rps12*, se ela de fato existe, tem um significado importante para a tradução da proteína *rps12*. Esta alteração causa uma mudança do codon, que determina o aminoácido Arg, para um codon "stop" (TGA). Entretanto, somente estudos de "Western Blot" e o sequenciamento direto das proteínas NAD3 e RP12 da mitocôndria de coix poderiam, inequivocamente, responder a questão sobre qual aminoácido está presente nestas posições, e se a proteína *rps12* está truncada na mitocôndria de coix.

Estes sítios de edição espécie-específicos ou conservados somente em algumas espécies de plantas, sugerem que mutações genômicas pontuais podem ter levado a eliminação, ou criação de sítios específicos em somente algumas linhagens, durante a evolução do grupo Spermatophyta. Uma vez que se tem descrito evidências pra edição de RNA em representantes das Gimnospermas, mas não nas briófitas, sugere-se que a origem deste mecanismo bioquímico predata a divergência de todos os grupos taxonômicas de plantas vasculares lenhosas (Hiesel et al., 1994). Covello e Gray (1993) propuseram um modelo baseado em três etapas, não necessariamente consecutivas e em alguma ordem

específica, para a evolução da edição de RNA e dos sítios de edição. Este modelo sugere que o aparecimento da atividade de edição de RNA, e das posições de nucleotídeos editáveis, ocorreu através de mutações que se fixaram por deriva genética. Assim, o processo teria se tornado co-evolucionário, no sentido de que a evolução da atividade de edição afetou a evolução dos sítios editáveis, o que levou à manutenção da atividade de edição por seleção natural. Sob este aspecto, a manutenção de várias posições de edição altamente conservadas, entre diferentes espécies de plantas, tem ocorrido em função das vantagens seletivas óbvias, uma vez que o processo torna a sequência mais similar àquela evolutivamente conservada, e que corresponde à proteína funcional. Neste caso a manutenção de eventos de edição espécie-específicos pode significar requerimentos específicos para a proteína na planta onde ocorre.

Analisando-se os sítios de edição silenciosos pode-se observar que a localização destes sítios é menos conservada que a localização de sítios de edição que alteram um aminoácido crítico. A análise de 51 clones de cDNA do gene *atp6*, preparados de 4 linhagens de sorgo (Kempken et al., 1995), revelou que muitos sítios de edição silenciosos foram editados com menos frequência, em relação aos sítios não silenciosos. Isto acontece, provavelmente por não ocorrer seleção contra mutações que destroem a eficiência de edição em um sítio, onde a alteração de C para U (ou o contrário) não tem efeito sobre a proteína codificada (Wilson e Hanson, 1996).

Outro ponto a se discutir, sobre a edição dos transcritos dos genes *nad3* e *rps12* de coix, é a extensão de edição verificada nos clones de cDNA. Em *Magnolia* spp (Perrotta et al., 1996), após análise dos cDNAs, observou-se que todos os 23 sítios de edição encontrados no gene *nad3* estavam completamente editados, enquanto que os sítios de edição do gene *rps12* estavam somente parcialmente editados. Transcritos parcialmente

editados parecem predominar no cDNA do gene *rps12*, em *Magnolia*, havendo uma distribuição randômica dos sítios editados. Em cebola, todas as posições de edição do gene *rps12* estavam parcialmente editadas (Perrotta et al., 1996). Encontrou-se, em diferentes espécies vegetais, uma população de cDNAs, parcialmente e completamente editados, derivados do loco *nad3-rps12*, como, por exemplo, em trigo (Gualberto et al., 1991), *Oenothera* sp (Schuster et al., 1990) e pinho (Karpinska et al., 1995). A porcentagem relativa de C não editados e T editados difere entre os sítios homólogos presentes nestas três espécies, e esta variação sugere diferenças espécie-específicas no tocante a eficiência do processo de edição (Perrotta et al., 1996).

Em trigo, a análise dos clones de cDNA obtidos a partir de moléculas de pré-mRNA do loco *nad3-rps12* mostraram a presença de um grande número de transcritos parcialmente editados de ambos os genes, não sendo encontrada nenhuma polaridade evidente para o processo de edição. Além disto o estudo da taxa de edição nos pré-mRNAs, mRNAs e mRNAs acoplados aos polissomos mostraram que principalmente os mRNA completamente editados são usados para a tradução (Gualberto et al., 1991). Neste sentido, foram os transcritos *nad3-rps12* de 0,9 kb encontrados associados ao polissomos, correspondentes ao mRNA, que estavam completamente editados. Resultados similares foram descritos para o gene *cox2* do DNAm de milho (Yang e Mulligan, 1991) e de petunia (Sutton et al., 1991).

Wilson e Hanson (1996) determinaram uma correlação entre a porcentagem de edição do transcrito, e a abundância de transcritos do gene *nad3* na mitocôndria de petunia. Ambos os caracteres são controlados por um único alelo nuclear. Nos genótipos que exibem transcritos em pequena quantidade, a correlação poderia ser explicada devido ao "turn-over" rápido dos transcritos, antes que edição fosse completamente terminada; nos

genótipos que exibem abundância de transcritos, a meia vida deles é maior, o que possibilitaria a finalização do processo de edição. Uma hipótese alternativa seria a de que a existência de um processo de edição menos eficiente levaria a um “turn over” mais rápido das moléculas de RNA, visto que a falta de edição poderia causar uma desestabilização dos transcritos; já uma edição rápida levaria à estabilização dos transcritos. Para muitas espécies analisadas a ocorrência de transcritos parcialmente editados tem sido correlacionada com a complexidade do padrão de transcrição em mitocôndria de plantas (Bonnard et al., 1992).

Assim, considerando-se o exposto, o fato dos transcritos *nad3-rps12* de coix estarem extensivamente editados pode ser explicada pelo padrão de transcrição simples deste “cluster” gênico, representado por uma única banda (Figura 20), e estabilidade elevada do transcrito. Se existe algum transcrito primário, este é rapidamente processado originando o mRNA de 1,3 kb, o qual se acumula em um alto nível no “steady-state”. Assim, o mecanismo de edição disporia de um longo período de tempo, durante o qual ele poderia encontrar os sítios a serem editados. Da mesma forma, em girassol e cebola (Perrotta et al., 1996), onde encontrou-se um único e abundante transcrito dos genes *nad3-rps12*, observou-se a ocorrência de poucos cDNAs com edição incompleta.

## 8. CONCLUSÃO

- Quatro das seis *orfs* analisadas neste trabalho (*orfs 86a, orf167, orf99 e orf207*) possuem fragmentos homólogos no DNAmT de muitas das espécies vegetais analisadas.
- O isolamento e sequenciamento do fragmento de DNAmT de coix reconhecido na hibridização com a *orf167* revelou um “cluster” que contém os genes *trnS/pseudo-tRNA/nad3/rps12*. A região de homologia deste “cluster” com a *orf167* compreende o pseudo-tRNA e o gene *nad3*.
- Estudos de expressão dos genes *nad3 e rps12* mostram que eles são cotranscritos em uma molécula de 1,3 kb, a qual é editada em vários pontos. A maioria destas edições são fundamentais para a expressão da proteína correta.

## 9. PERSPECTIVAS

- Além da *orf167*, outras *orfs* também se mostraram conservadas, entre as diversas espécies de plantas estudadas neste trabalho, e poderiam ter seu estudo aprofundado, de modo a verificar a identidade de seus fragmentos homólogos da mitocôndria de plantas superiores.
- Seria interessante verificar o que a *orf167* reconheceu nas outras espécies de plantas, uma vez que se sabe que em milho e coix a *orf167* se hibridizou com o gene *nad3*, mas nas outras espécies reconheceu bandas que não correspondem ao gene *nad3*.
- Muitos estudos podem ser feitos no transcrito do "cluster" *nad3-rps12*, buscando reconhecer sítios de iniciação da transcrição e processamento, caso existam, e assim conhecer o padrão de transcrição destes genes em coix. Seria também interessante determinar-se a região promotora do transcrito, buscando motivos conservados, e sítios de ligação de ribossomos dentro do transcrito.

## 10. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. e Watson J. D. (1994)** *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc. New York and London (3rd).
- Araya A. Begu D. e Litvak S. (1994)** RNA editing in plants. *Physiologia Plantarum* 91: 543-550.
- Attardi G. e Schatz G. (1988)** Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4: 289-333.
- Bendich A. J. (1993)** Reaching for thering: the study of the mitochondrial genome structure. *Curr. Genet.* 24: 279-290
- Begu D., Mercado A., Farre J. C., Moenne A., Holuigue L., Araya A., Jordana X. (1998)** Editing status of mat-r transcripts in mitochondria from two plant species: C-to-U changes occur in putative functional RT and maturase domains. *Curr. Genet.* 33:420-8.
- Binder S. e Brennicke A . (1993)** A tRNA gene transcription initiation site is similar to mRNA and rRNA promoters in plant mitochondria. *Nucleic Acids Research* 21:5012-5019.
- Binder S., Hatzack F., Brennicke A. (1995)** A novel pea mitochondrial in vitro transcription system recognizes homologous and heterologous mRNA and tRNA promoters. *J. Biol. Chem.* 270:22182-9.
- Binder S., Marchfelder A .e Brennicke A . (1996)** Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 32:303-314.
- Bock R. e Maliga P. (1995)** In vivo testing of a tobacco plastid DNA segment for guide RNA function in psbL editing. *Mol. Gen. Genet.* 247:439-443.
- Bonnard G., Gualberto J. M., Lamattina L., Grienerberger J. M. (1992)** RNA editing in plant mitochondria *Crit. Ver. Plant. Sci.* 10: 503-524.

**Bonnard G. e Grienenberger J. M. (1995)** A gene proposed to encode a transmembrane domain of an ABC transporter is expressed in wheat mitochondria..Mol. Gen. Genet. 246: 91-99.

**Börner G. V., Mörl M., Wissinger B., Brennicke A . e Schmelzer C. (1995)** RNA editing of a group II intron in *Oenothera* as a prerequisite for splicing. Mol. Gen. Genet. 246:739-744.

**Braun C. J. e Levings III C. S. (1985)** Nucleotide sequence of the F1-ATPase  $\alpha$  subunit gene from maize mitochondria. Plant Physiol. 79:571-577.

**Brears T., Lonsdale D.M. (1988)** The sugar beet mitochondrial genome: A complex organization generated by homologous recombination. Mol. Gene. Genet. 214: 514-522

**Breiman A. e Galun E. (1990)** Nuclear-mitochondrial interrelation in angiosperms. Plant Science 71: 3-19.

**Brennicke A., Moller S., Blanz P. A. (1985)** The 18S and 5S ribosomal RNA genes in *Oenothera* mitochondria: Sequence rearrangements in the 18S and 5S rRNA genes.Mol. Gen. Genet. 198: 404-410.

**Brennicke A., Grohmann L., Hiesel R., Knoop V., Schuster W. (1993)** The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants. FEBS Lett 325:140-5.

**Brown G. G., Auchincloss A. H., Covello P. S., Gray M. W., Menassa R., Singh M. (1991)** Characterization of transcription initiation sites on the soybean mitochondrial genome allows identification of a transcription-associated sequence motif. Mol. Gen. Genet. 228:345-355.

- Caoile A. G. F. S. e Stern D. B. (1997)** A conserved core element is functionally important for maize mitochondrial promoter activity in vitro. *Nucleic Acids Research* 25:4055-4060.
- Ceci L.R., Veronico P., Gallerani R. (1996)** Identification and mapping of tRNA genes on the *Helianthus annuus* mitochondrial genome. *DNA Seq.* 6:159-166.
- Chanut F. A ., Grabau E. A . e Gesteland R. F. (1993)** Complex organization of the soybean mitochondria genome: recombination repeats and multiples transcripts at the *atpA* loci. *Curr. Genet.* 23:234-247.
- Covello P. S., Gray M. W. (1991)** Sequence analysis of wheat mitochondrial transcripts capped in vitro: definitive identification of transcription initiation sites. *Curr. Genet.* 20:245-251.
- Covello P. S., Gray M.W. (1993)** On the evolution of RNA editing. *Trends Genet.* 9:265-268.
- Cronquist A. (1988)** The evolution and classification of flowering plants (2<sup>nd</sup> edn) New York Botanic Garden, New York.
- Cunningham R. S., Bonen L., Doolittle W. F., Gray M. W. (1976)** Unique species of 5S, 18S, and 26S ribosomal RNA in wheat mitochondria. *FEBS Letters* 69: 116-122.
- Dawson A. J., Jones V.P. e Leaver C. J. (1984)** The apocytochrome b gene in maize mitochondria does not contain introns and is preceded by a potential ribosome binding site. *EMBO J* 4: 1617-1623.
- Dawson A. J., Jones V.P. e Leaver C.J. (1988)** Strategies for the identification and analysis of higher plant mitochondrial genes. In: *Methods for Plant Molecular Biology.* 293-307.
- Dewey R. E., Levings C. S.III e Timothy D. H. (1985a)** Nucleotide sequence of the ATPase subunit 6 gene of maize mitochondria. *Plant Physiol.* 79: 914-919.

**Dewey R. E., Schuster A. M., Levings C. S.III e Timothy D.H. (1985b)** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1015-1019.

**Dombrowski S., Brennicke A. e Binder S. (1997)** 3'-Inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators. EMBO J 16: 5069-5076.

**Doyle J. J. e Doyle J. J. (1988)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. FOCUS (BRL) 12: 13-15.

**Falconet D., Seignac M. e Quétier F. (1988)** Nucleotide sequence and determination of the extremities of the 26S ribosomal RNA gene in wheat mitochondria: evidence for sequence rearrangements in the ribosomal genes of higher plants. Curr. Genet. 13:75-82.

**Feinberg A. P. e Vogelstein B. (1983)** A technique for radio-labeling DNA restriction fragments to high specific activity. Anal Biochem 132:6-13.

**Fox T. D. e Leaver C. J. (1981)** The *Zea mays* mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons. Cell 26: 315-323.

**Gäbler L., Hutz U., Liddel A., Leaver C.J., Schröder W., Brennicke A. e Grohmann L. (1994)** The 42.5 kDa subunit of the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) is in higher plants encoded by the mitochondrial *nad7* gene. Mol. Gen. Genet. 244: 33-40.

**Giese A., Thalheim C., Brennicke A. e Binder S. (1996)** Correlation of nonanucleotide motifs with transcript initiation of 18S rRNA genes in mitochondria of pea, potato and *Arabidopsis*. Mol. Gen. Genet. 252:429-436.

**Glaubitz J. C., Carlson J. E. (1992)** RNA editing in the mitochondria of a conifer. Curr Genet 22:163-165.

- Gonzalez D. H., Bonnard G. e Grienenberger J. (1993)** A gene involved in the biogenesis of cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria. *Curr. Genet.* 24:248-255.
- Grabau E. A., Asleson C. M. e Hegenbach (1990).** Nucleotide sequence and transcription of the soybean mitochondrial ATPase subunit 9 gene. *Plant Mol. Biol.* 15: 183-186.
- Gray M. W. (1989a)** Origin and evolution of mitochondria DNA. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5: 25-50
- Gray M. W. (1989b)** The evolutionary origins of organelles. *TIG* 5: 294-299
- Gray M. W., Cedergren R., Abel Y. e Sankoff D. (1989)** On the evolutionary of the plant mitochondrion and its genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2267-2271.
- Gray M. W., Hanic-Joyce P. J., Covello P. S. (1992)** Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:145-175.
- Gray M. W., Burger G. e Lang B. F. (1999)** Mitochondrial Evolution. *Science* 283: 1476-1481.
- Grohmann L., Brennicke A. e Schuster W. (1992)** The mitochondrial gene encoding ribosomal protein S12 has been translocated to the nuclear genome in *Oenothera*. *Nucleic Acids Res.* 20:5641-5646.
- Grohmann L., Brennicke A. e Schuster W. (1993)** Genes for mitochondrial ribosomal proteins in plants. In: Nierhaus K. H., Francesch F., Subramanian A. R., Erdman V. A., Wittmamnn-Liebold B. (eds) *The translational apparatus*, Plenum Press, New York pp599-607.
- Grosskopf D. e Mulligan R. M. (1996)** Developmental- and tissue-specificity of RNA editing in mitochondria of suspension-cultured maize cells and seedlings. *Curr. Genet* 29:556-563.

**Gualberto J. M., Wintz H., Weil J. H. e Grieneberger J. M. (1988)** The genes coding for subunit 3 of NADH-dehydrogenase and for ribosomal protein S12 are present in the wheat and maize mitochondrial genomes and are co-transcribed. *Mol. Gen. Genet.* 215: 118-127.

**Gualberto J. M., Domon C., Weil J. H. e Grienenberger J. M. (1990)** Structure and transcription of the gene coding for subunit 3 of cytochrome oxidase in wheat mitochondria. *Curr. Gen.* 17:41-47.

**Gualberto J. M., Bonnard G., Lamattina L., Grienenberger J. M. (1991)** Expression of the wheat mitochondrial *nad3-rps12* transcription unit: correlation between editing and mRNA maturation. *Plant Cell* 3:1109-20.

**Gutierrez S., Lelandais C., Paepe R. D., Vedel F., Chetrit P. (1997)** A mitochondrial sub-stoichiometric *orf87-nad3-nad1* exonA co-transcription unit present in Solanaceae was amplified in the genus *Nicotiana*. *Curr. Genet.* 31:55-62.

**Handa H. (1992)** RNA editing of rapeseed mitochondrial *atp9* transcripts:RNA editing changes four amino acids, but termination codon is already encoded by genomic sequence. *Jpn J. Genet.* 68:47-54.

**Handa H., Bonnard G. e Grienenberger J-M. (1996)** The rapessed mitochondrial gene encoding a homologue of the bacterial protein Ccl1 is divided into two independently transcribed reading frames. *Mol. Gen. Genet.* 252: 292-302.

**Handa H., Kubo N., Kadowaki K. (1998)** Genes for the ribosomal S4 protein encoded in higher plant mitochondria are transcribed, edited, and translated. *Mol. Gen. Genet.* 258:199-207.

**Hanic-Joyce P. J., Gray M. W. (1990)** Processing of transfer RNA precursors in a wheat mitochondrial extract. *J. Biol. Chem.* 265:13782-13791.

**Hanson M. R. e Folkerts O. (1992)** Structure and function of the higher plant mitochondrial genome. *Internat. Rev. Citol.* 141: 129-165.

**Haouazine N., Pereira de Souza A., Jubier M. F., Lancelin D., Delcher E. e Lejeune B. (1992)** The wheat mitochondrial genome contains an orf showing sequence homology to the gene encoding the subunit 6 of the NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Plant Mol. Biol.* 20: 395-404.

**Haouazine N., Takvorian A., Jubier M., Michel F. e Lejeune B. (1993)** The *nad6* gene and the exon *d* of *nad1* are co-transcribed in wheat mitochondria. *Curr. Genet.* 24:533-538.

**Haouazine-Takvorian N., Takvorian A., Jubier M. F. e Lejeune B. (1997)** Genes encoding subunit 6 of NADH dehydrogenase and subunit 6 of ATP synthase are co-transcribed in maize mitochondria. *Curr. Genet.* 31:63-69.

**Heins L. e Schmitz U.K. (1996)** A receptor for protein import into potato mitochondria. *Plant J.* 9:829-839

**Hiesel B., Schobel W., Schuster W. e Brennicke A. (1987)** The cytochrome oxidase subunit I and II genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promoter sequences. *EMBO J.* 6: 29-34.

**Hiesel R., Combettes B., Brennicke A. (1994)** Evidence for RNA editing in mitochondria of all major groups of land plants except the Bryophyta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91:629-633.

**Hoisington D., Khairallah M. e González-de-León D. (1994)** Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Segunda edição. México.

**Howad W. e Kempken F. (1997)** Sequence analysis and transcript processing of the mitochondrial *nad3-rps12* genes from *Sorghum bicolor*. *Plant Sci.* 129: 65-68.

**Issac P. G., Brennicke A., Dunbar S. M. e Leaver C. J. (1985a)** The mitochondrial genome of fertile maize (*Zea mays*) contain two copies of the gene encoding the  $\alpha$ -subunit of the F<sub>1</sub>-ATPase. *Curr. Genet.* 10: 321-328.

**Issac P. G., Jones V. P. e Leaver C. J. (1985b)** The maize cytochrome c oxidase subunit I gene: sequence, expression and rearrangement in cytoplasmic male sterile plants. *EMBO J.* 4: 1617-1623.

**Itani K., Handa H. (1998)** Rapeseed mitochondrial *ccb206*, a gene involved in cytochrome c biogenesis, is co-transcribed with the *nad3* and *rps12* genes: organization, transcription, and RNA editing of the *nad3/rps12/ccb206* locus. *Curr. Genet.* 34:318-325.

**Ito Y., Nakazono M., Kadowaki K., Tsutsumi N. e Hirai A. (1996)** RNA editing of transcripts of the gene for apocytochrome b (*cob*) in rice mitochondria. *Genes Gent. Syst.* 71:85-89.

**Jekabsons W. e Schuster W. (1995)** *Orf250* encodes a second subunit of an ABC-type transporter in *Oenothera* mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 246: 166-173.

**Kadowak K., Ozawa K., Kazama S., Kubo N. e Akihama T. (1995)** Creation of a initiation codon by RNA editing in *coxI* transcript from tomato mitochondria. *Curr. Genet.* 28:415-422.

**Kaleikau E. K., André C. P. e Walbot V. (1993)**. Transcription of the gene coding for subunit 9 of ATP synthase in rice mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 22: 899-905.

**Karpinska B., Karpinski S. e Hallgren J. E. (1995)** The genes encoding subunit 3 of NADH dehydrogenase and ribosomal protein S12 are co-transcribed and edited in *Pinus sylvestris* (L.) mitochondria. *Curr. Genet.* 28:423-428.

- Kemmerer E.C. e Wu R. (1990)** The *Pisum sativum* mitochondrial gene encoding cytochrome oxidase subunit I has an unusual transcription pattern. *Gene* 89:157-162
- Kempken F., Hofken G., Pring D. R. (1995)** Analysis of silent RNA editing sites in *atp6* transcripts of *Sorghum bicolor*. *Curr. Genet.* 27:555-558.
- Kim K-S., Schuster W., Brennicke A. e Choi K-T. (1991)** Korean ginseng mitochondrial DNA encodes a intact *rps12* gene downstream of the *nad3* gene. *Plant Physiol.* 97: 1602-1603.
- Knoop V., Ehrhardt T., Lättig K. e Brennicke A. (1995)** The gene for ribosomal protein S10 is present in mitochondria of pea and potato but absent from those of *Arabidopsis* e *Oenothera*. *Curr. Genet.* 27:559-564
- Kranz R., Lill R., Goldman B., Bonnard G. e Merchant S. (1998)** Molecular mechanisms of cytochrome c biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* 29:383-396.
- Krishnasamy S., Grant R. A. e Makaroff C. A. (1994)** Subunit 6 of the Fo-ATP synthase complex from cytoplasmic male-sterile radish: RNA editing and NH<sub>2</sub>-terminal protein sequencing. *Plant Mol. Biol.* 24:129-141.
- Kumar R. e Levings III C. S. (1993)** RNA editing of a chimeric maize mitochondrial gene transcript is sequence specific. *Curr. Genet.* 23:154-159.
- Lipook B., Brennicke A. e Unseld M. (1996)** The *rps4*-gene is encoded upstream of the *nad2*-gene in *Arabidopsis* mitochondria. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377:251-257.
- Liu A. W., Narayanan K. K., André C. P., Kaleikau E. K. e Walbot V. (1992).** Co-transcription of *orf25* and *coxIII* in rice mitochondria. *Curr. Genet.* 21:507-503.
- Leaver C. J. e Harmey M. A. (1976)** Higher-plant mitochondrial ribosomes contain a 5S ribosomal ribonucleic acid component. *Biochem. J.* 157:275-277.

- Lejeune B., Delorme S., Delcher E. e Quéfier F. (1987)** Recombination in wheat mitochondria DNA: occurrence of nine different genomic contexts for the 18S-5S genes. *Plant Physiol. Biochem.* 25:227-233.
- Lizama L., Holuigue L., Jordana X. (1994)** Transcription initiation sites for the potato mitochondrial gene coding for subunit 9 of ATP synthase (*atp9*) *FEBS Lett.* 349:243-248.
- Lonsdale D. M. (1984)** A review of the structure and organisation of the mitochondrial genome of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 3: 201-206
- Lonsdale D. M., Hodge T. P. e Fauron C. M. R. (1984)** The physical map and organisation of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. *Nucl. Acid. Res.* 12: 9249-9260.
- Lu B. e Hanson M. R. (1996)** Fully edited and partially edited *nad9* transcripts differ in size and both are associated with polysomes in potato mitochondria *Nucleic Acids Research* 24:1369-1374.
- Lu B., Wilson R. K., Phreaner C. G., Mulligan R. e Hanson M. R. (1996)** Protein polymorphism generated by differential RNA editing of a plant mitochondrial *rps12* gene *Mol. Cel. Biol.* 16:1543-1549.
- Maloney A. P., Traynor P. L., Levings III C. S. e Walbot V. (1989)** Identification in maize mitochondrial 26S rRNA of a short 5'-end sequence possibly involved in transcription initiation and processing. *Curr. Genet.* 15:207-12.
- Maloney A. P. e Walbot V. (1990)** Structural analysis of mature and dicistronic transcript from the 18 S and 5 S ribosomal RNA genes of maize mitochondria. *J. Mol. Biol.* 213:633-649.
- Manna E. e Brennicke A. (1985)** Primary and secondary structure of 26S ribosomal RNA of *Oenothera* mitochondria. *Curr. Genet.* 9: 505-515.

- Marchfelder A., Schuster W. e Brennicke A. (1990)** In vitro processing of mitochondrial and plastid derived tRNA precursors in a plant mitochondrial extract. *Nucleic Acids Res.* 18:1401-6.
- Marchfelder A. e Brennicke A. (1993)** Plant mitochondrial RNase P and *E. coli* RNase P have different substrate specificities. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 29:621-633.
- Marchfelder A. e Brennicke A. (1994)** Characterization and partial purification of tRNA processing activities from potato mitochondria. *Plant Physiol.* 105:1247-1254.
- Marchfelder A., Brennicke A. e Binder S. (1996)** RNA editing is required for efficient excision of tRNA(Phe) from precursors in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271:1898-1903.
- Marechal-Drouard L., Ramamonjisoa D., Cosset A., Weil J. H. e Dietrich A. (1993)** Editing corrects mispairing in the acceptor stem of bean and potato mitochondrial phenylalanine transfer RNAs. *Nucleic Acids Res.* 21:4909-4914.
- Marechal-Drouard L., Kumar R., Remacle C. e Small I. (1996)** RNA editing of larch mitochondrial tRNA<sup>HIS</sup> precursors is a prerequisite for processing. *Nucleic Acid Res.* 24:3229-3234.
- Mayer R. M., Zelt P., Kössel H., Bonnard G., Gualberto J. M. e Grienberger J. M. (1996)** RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 32:343-365.
- Menand B., Marechal-Drouard L., Sakamoto W., Dietrich A. e Wintz H. (1998)** A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:11014-11019.
- Michel F., Umesono K. e Ozeki H. (1989)** Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns - a review. *Gene* 82: 5-30.

- Miyata S., Nakazono M. e Hirai A. (1998)** Transcription of plastid-derived tRNA genes in rice mitochondria. *Curr. Genet.* 34:216-220.
- Muise R.C. e Hauswirth W. W. (1992)** Transcription in maize mitochondria: effects of tissue and mitochondrial genotype. *Curr. Genet.* 22:235-242.
- Muise R. C. e Hauswirth W. W. (1995)** Selective DNA amplification regulates transcripts levels in plant mitochondria. *Curr. Genet.* 28: 113-121.
- Mulligan R. M., Maloney A. P. e Walbot V. (1988)** RNA processing and multiple transcription initiation sites result in transcript size heterogeneity in maize mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 211:373-380.
- Mulligan R. M., Leon P. e Walbot V. (1991)** Transcriptional and posttranscriptional regulation of maize mitochondrial gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11:533-543.
- Nakazono M., Tsutsumi N., Sigiura M. e Hirai A. (1995)** A small repeated sequence contains the transcription initiation sites for both *trnfM* and *rrn26* in rice mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 28:343-346.
- Nakazono M., Ito Y., Tsutsumi N. e Hirai A. (1996a)** The gene for a subunit of an ABC-type heme transporter is transcribed together with the gene for subunit 6 of NADH dehydrogenase in rice mitochondria. *Curr. Genet.* 29:412-416.
- Nakazono M., Ishikawa M., Yoshida K. T., Tsutsumi N. e Hirai A. (1996b)** Multiple initiation sites for transcription of a gene for subunit 1 of F1-ATPase (*atp1*) in rice mitochondria. *Curr. Genet.* 29:417-422.
- Nass M. M. K e Nass S. N. (1963)** Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J. Cell Biol.* 19: 593-627.
- Newton, K. J. (1988).** Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 503-532.

- Nugent J.M., Palmer J.D. (1991)** RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66:473-481.
- Oda K.; Yamato K.; Ohta E., Nakamura Y.; Takemura M.; Nozato N.; Akashi K., Kanegae T.; Ogura Y.; Kohchi T. e Ohyama K. (1992)** Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: a primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 223: 1-7.
- Ohta E., Oda K., Yamato K., Nakamura Y., Takemura M., Nozato N., Akashi K., Ohyama K. e Michel F. (1993)** Group I introns in the liverwort mitochondrial genome: the gene coding for subunit 1 of cytochrome oxidase shares five intron positions with its fungal counterparts. *Nucleic Acids Res.* 21:1297-1305.
- Palmer J. D. e Shields C. R. (1984)** Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature.* 307: 437-440.
- Palmer J. D. e Herbon L. A. (1987)** Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr. Genet.* 11: 565-570.
- Palmer J. D. e Herbon L. A. (1988)** Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *J. Mol. Evol.* 28: 87-97.
- Palmer, J. D. (1990)** Contrasting modes and tempos of genome evolution in land plants organelles. *Trends Genet.* 6: 115-120.
- Pereira de Souza A.; Jubier M.-F.; Delcher E.; Lancellin D. e Lejeune B. (1991)** A trans-splicing model for the expression of the tripartite *nad5* gene in wheat and maize mitochondria. *Plant Cell.* 3: 1363-1378.
- Perrotta .G, Regina T.M., Ceci L.R., Quagliariello C. (1996)** Conservation of the organization of the mitochondrial *nad3* and *rps12* genes in evolutionarily distant angiosperms. *Mol. Gen. Genet.* 251:326-337.

**Phreaner C. G., Williams M. A. e Mulligan M. (1996)** Incomplete editing of *rps12* transcripts results in the synthesis of polymorphic polypeptides in plant mitochondria *The Plant Cell* 8: 107-117.

**Prioli L. M., Huang J. e Levings C. S. 3d (1993)** The plant mitochondrial open reading frame *orf221* encodes a membrane-bound protein. *Plant Mol. Biol.* 23:287-295.

**Quagliariello C., Saiardi A. e Gallerani R. (1990)** The cytochrome oxidase subunit III gene in sunflower mitochondria is cotranscribed with an open reading frame conserved in higher plants. *Curr. Genet.* 18:355-363.

**Rankin C. T., Cutright M. T. e Makaroff C. A. (1996)** Characterization of the radish mitochondrial *nad3/rps12* locus: analysis of recombination repeats and RNA editing. *Curr. Genet.* 29:564-571.

**Rasmussen J. e Hanson M. R. (1989)** A NADH dehydrogenase subunit gene is co-transcribed with the abnormal *Petunia* mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility. *Mol. Gen. Genet.* 215:332-336

**Remacle C. e Marechal-Drouard L. (1996)** Characterization of the potato mitochondrial transcription unit containing 'native' *trnS* (GCU), *trn* (GAA) and *trnP* (UGG). *Plant Mol. Biol.* 30:553-563.

**Rogers S. O., Bendich A. J. (1985)** *Plant Mol Biol* 5: 69

**Rurek M., Oczkowski M. e Augustyniak H. (1998)** Conservation of the structure and organization of lupin mitochondrial *nad3* and *rps12* genes. *Acta Biochim. Pol.* 45:695-699.

**Sambrook J.; Fritsch E. F. e Maniatis T. (1989)** *Molecular Cloning, a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schuster W. e Brennicke A . (1986)** Pseudocopies of the ATPase  $\alpha$ -subunit gene in *Oenothera* mitochondria are present on different circular molecules. Mol. Gen. Genet. 204:29-35.

**Schuster W., Hiesel R., Isaac P. G., Leaver C. J. e Brennicke A. (1986)** Transcript termini of messenger RNAs in higher plant mitochondria. Nucleic Acids Res. 14:5943-5954.

**Schuster W. e Brennicke A. (1988)** Interorganellar sequence transfer: plant mitochondrial DNA is nuclear, is plastide, is mitochondrial. Plant Sci. 54: 1-10.

**Schuster W. e Brennicke A. (1989)**. Conserved sequence elements at putative processing sites in plant mitochondria. Curr. Genet. 14: 187-192.

**Schuster W., Wissinger B., Unseld M. e Brennicke A. (1990)** Transcripts of the NADH-dehydrogenase subunit 3 gene are differentially edited in *Oenothera* mitochondria. EMBO J 9:263-269.

**Schuster W. (1993)** Ribosomal protein gene *rpl5* is cotranscribed with the *nad3* gene in *Oenothera* mitochondria. Mol. Gen. Genet. 240:445-449.

**Schuster W., Combettes B., Flieger K. e Brennicke A . (1993)** A plant mitochondrial gene encodes a protein involved in cytochrome c biogenesis. Mol. Gen. Genet. 239:49-57.

**Schuster W. (1994)** The highly edited *orf206* in *Oenothera* mitochondria may encode a component of a heme transporter involved in cytochrome c biogenesis. Plant Mol. Biol. 25: 33-42

**Schuster W. e Brennicke A. (1994)** The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 61-78.

- Shikanai T., Nakata S., Harada K. e Watanabe K. (1996)** Analysis of the heterogeneous transcripts of the highly edited *orf206* in tomato mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 37:692-696.
- Stern D. B. e Palmer J.D. (1984)** Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 1946-1950.
- Stern D. B., Bang A. G. e Thompson W. F. (1986)** The watermelon mitochondrial *URF-1* gene: evidences for a complex structure. *Curr. Genet.* 10: 857-869.
- Sutton C. A., Conklin P. L., Pruitt K. D. e Hanson M. R. (1991)** Editing of pre-mRNAs can occur before cis- and trans-splicing in *Petunia* mitochondria. *Mol. Cell Biol.* 11:4274-4277.
- Suzuki T., Kazama S., Hirai A., Akihama T. e Kadowaki K. (1991)** The rice mitochondrial *nad3* gene has an extended reading frame at its 5' end: nucleotide sequence analysis of rice *trnS*, *nad3*, and *rps12* genes. *Curr. Genet.* 20:331-337.
- Takemura M., Oda K., Yamato K., Ohta E., Nakamura Y., Nozato N., Akashi K. e Ohyama K. (1992)** Gene "cluster"s for ribosomal proteins in the mitochondrial genome of a liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Nucleic Acids Res.* 20:3199-3205.
- Unsold M., Marienfeld J. R., Brandt P. e Brennicke A . (1997)** The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics.* 15:57-61.
- Vaughn J. C., Mason M. T., Sper-whitis G. L., Kuhlman P. e Palmer J. D. (1995)** Fungal origin by horizontal transfer of a plant mitochondrial group I intron in the chimeric *coxI* gene of *Peperomia*. *J. Mol. Evol.* 41:563-572.

- Vedel, F. e Quétier, F. (1974)** Physico-chemical characterization of mitochondrial DNA from potato tubers. *Bioq. Bioph. Acta* 340: 374-387.
- Walbot V. (1991)** RNA editing fixes problems in plant mitochondrial transcripts. *TIG* 7:37-39.
- Ward B. L., Anderson R. S. e Bendich A. J. (1981)** The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (*Cucurbitaceae*). *Cell* 25: 793-803.
- Ward G.C. e Levings III C. S. ( 1991)** The protein-encoding gene *T-urf3* is not edited in maize mitochondria *Plant Mol. Biol.* 17:1083-1088.
- Williams M. A., Kutcher B. M. e Mulligan R. M.(1998)** Editing site recognition in plant mitochondria: the importance of 5'-flanking sequences. *Plant Mol. Biol.* 36:229-237.
- Wilson R. K. e Hanson M. R. (1996)** Preferential RNA editing at specific sites within transcripts of two plant mitochondrial genes does not depend on transcriptional context or nuclear genotype. *Curr.Genet.* 30:502-508.
- Wintz H., Grienenberger J. M., Weil J.M. e Lonsdale D.M. (1988)** Location and nucleotide sequence of two tRNA genes and a tRNA pseudogene in maize mitochondrial genome: evidence for the transcription of a chloroplast gene in mitochondria *Curr. Genet.* 13: 247-254.
- Wintz H., Chen H. C. e Pillay D. T. N. (1989)** Partial characterization of the gene coding for the subunit of soybean NADH dehydrogenase. *Curr. Genet.* 15: 155-160.
- Wissinger B., Schuster W. e Brennicke A. (1991)** Trans splicing in *Oenothera* mitochondria: *nad1* mRNAs are edited in exon and trans-splicing group II intron sequences. *Cell* 65:473-482

**Xue Y., Davies D. R. e Thomas C. M. (1990)** Sugar beet mitochondria contain an open reading frame showing extensive sequence homology to the subunit 2 gene of the NADH:ubiquinone reductase complex. *Mol. Gen. Genet.* 221: 195-198.

**Yang A. J. e Mulligan R. M. (1991)** RNA editing intermediates of *cox2* transcripts in maize mitochondria. *Mol. Cell Biol.* 11:4278-4281.

**Yang A. J. e Mulligan M. (1996)** Identificación de un 4.5 S-like ribonucleoproteína en mitocondrias de maíz. *Nucleic Acids Res.* 24: 3601-3606.

**Zalungo S., Quinones V., Moenne A., Holuigue L. e Jordana X. (1994)** A ribosomal protein S10 is found in the mitochondrial genome in *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.* 25: 743-749.

**Zalungo S., Quinones V., Moenne A., Holuigue L. e Jordana X. (1995)** Splicing and editing of *rps10* transcripts in potato mitochondria. *Curr. Genet.* 27:565-571.