**ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO: EVOLUÇÃO DA TÉCNICA E SUA
APLICAÇÃO EM UM CASO ESPECÍFICO**

GILDA SANTOS MUHLEN
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Profª Drª ALINE A.
PIZZIRANI-KLEINER.

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Genética e Melhoramento
de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1995

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Mühlen, Gilda Santos

Eletoforese em campo pulsado: evolução da técnica e sua aplicação em um caso específico / Gilda Santos Mühlen. - - Piracicaba, 1995.
147p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.

Bibliografia.

1. Aspergilo - Genética molecular 2. DNA de aspergilo - Análise 3. Eletoforese I. Título

CDD 589.24

**ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO: EVOLUÇÃO DA TÉCNICA E SUA
APLICAÇÃO EM UM CASO ESPECÍFICO**

GILDA SANTOS MUHLEN

Aprovada em: 30.06.1995

Comissão julgadora:

Prof^aDr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner ESALQ/USP

Prof^aDr^a Maria Helena Pelegrinelli Fungaro UEL

Prof^aDr^a Maria Lúcia Carneiro Vieira ESALQ/USP

Aline A. Pizzirani-Kleiner
Prof^aDr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

Orientadora

Ao meu pai.

Agradecimentos

Registro aqui meus agradecimentos às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta Dissertação, em especial:

À minha orientadora, ProfªDrª Aline A. Pizzirani-Kleiner, pela confiança e apoio em todas as situações difíceis surgidas no período em que trabalhei no laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ e, também, por ter adaptado e editado magnificamente todas as figuras incluídas neste volume.

À ProfªDrª Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, que me incentivou e ajudou a fazer os ensaios de genética molecular que se tornaram objeto desta Dissertação. Agradeço, também, seu exaustivo empenho, que tornou possível a emoção de ver nosso trabalho (em conjunto com outros pesquisadores) publicado.

À ProfªDrª Mariza Vieira de Queiroz, por ter acompanhado meus ensaios com eletroforese em campo pulsado e pelo muito que me ensinou sobre como proceder num laboratório.

À colega Renata Castiglioni Pascon, pelas inumeráveis conversas que tivemos durante todo curso de mestrado, compartilhando as "descobertas" no estudo da genética e da biologia molecular.

Ao técnico José Antonio da Silva, pela

solicitude com que sempre atendeu a todos no laboratório.

Às bibliotecárias Silvana Marchizelli Gregório e Aparecida Elizabeth dos Santos da Silva, pela tolerância e eficiência, principalmente no período em que redigi o item Revisão Bibliográfica.

Meus agradecimentos, por fim, ao CNPq, que custeou meus estudos de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
SUMMARY	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Eletroforese em campo pulsado	3
2.2 Transformação genética	59
3. MATERIAL E METODOS	80
3.1 Linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	80
3.2 Linhagem de <i>Escherichia coli</i>	82
3.3 Plasmídios	82
3.4 Meios de cultura	82
3.5 Soluções	89
3.6 Obtenção de protoplastos de <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i>	100
3.7 Preparo de amostras de DNA para eletrofore- se em campo pulsado	101
3.8 Cruzamento de linhagens de <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i> (via sexuada)	102
3.9 Extração de plasmídios de <i>Escherichia coli</i> (Kit Qiagen)	104
3.10 Transformação de bactérias	106
3.11 Transferência de DNA de gel de agarose para membrana de náilon	108
3.12 Separação de cromossomos de <i>Aspergillus</i> <i>nidulans</i> por eletroforese	111

3.13	Estoque de <i>Aspergillus nidulans</i> em sílica	112
3.14	Estoque de bactérias em glicerol	113
3.15	Hibridação de sondas de plasmídios com DNA fixado em membrana de náilon	113
3.16	Marcação de sondas de DNA ("random priming")	115
3.17	Purificação de sondas de DNA marcadas, por cromatografia em gel filtrante (Coluna de SEFADEX)	116
3.18	Dessalinização de soluções de DNA	117
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
5.	CONCLUSÕES	125
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
	ANEXO	142

**ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO: EVOLUÇÃO DA TÉCNICA E SUA
APLICAÇÃO EM UM CASO ESPECÍFICO**

Autora: GILDA SANTOS MUHLEN

Orientadora: PROF^a DR^a ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO

Desde que a migração de íons em campo elétrico foi descoberta, a utilização dos princípios da eletroforese foi sendo aperfeiçoada por pesquisadores de áreas muito diversas. Novos modelos de equipamentos, diferentes tampões, substratos mais adequados, vêm sendo desenvolvidos constantemente.

Em genética, o uso da eletroforese para análise molecular de ácidos nucleicos é prática de rotina nos laboratórios. Um dos mais importantes aperfeiçoamentos recentes desta técnica foi a introdução de eletroforese em campo pulsado. Este tipo de eletroforese permite a resolução de moléculas muito maiores de DNA do que em campo elétrico constante. É possível, agora, separar fisicamente cromossomos de microrganismos, estabelecendo seu cariótipo eletroforético, assim como fazer mapeamento físico de grandes fragmentos de DNA.

Um exemplo do uso da técnica é descrito nesta dissertação: eletroforese em campo pulsado foi uti-

lizada para separar os cromossomos de uma linhagem de *Aspergillus nidulas* submetida previamente a bombardeamento de partículas de tungstênio recobertas com DNA (biobalística). Por meio de análise de Southern, foi possível demonstrar fisicamente a ocorrência de transformação por integração homóloga de um plasmídio no cromossomo III do fungo.

PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS: EVOLUTION OF THE
TECHNICS AND A SPECIFIC APPLICATION

Author: GILDA SANTOS MÜHLEN

Adviser: Profª Drª ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY

Since the discovery of the ions migration in electric fields, the utilization of electrophoretic principles have been improved by researchers from very different fields. New equipment models, different buffers, more adequate substrates, have been constantly developed.

In genetics, the use of electrophoresis in the molecular analysis of nucleic acids is a routine in many laboratories. One of the most important improvements was the introduction of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). This kind of electrophoresis enable us to separate DNA molecules much larger than those resolved by electrophoresis in continuous electric fields. Now, it is possible to physically separate microorganisms chromosomes, stabilizing their electrophoretic karyotypes, and also to map large DNA fragments.

An example of PFGE use is described in this paper: pulsed-field gel electrophoresis was employed to separate the chromosomes of an *Aspergillus nidulans* strain that was subjected to bombardment by DNA covered tungsten

particules (biolistic). By Southern analysis, it was possible to demonstrate the occurrence of transformation by plasmid homologous integration into the fungus chromosome III.

1. INTRODUÇÃO

A instalação de um equipamento (CHEF) para eletroforese em campo pulsado, num laboratório de genética de microrganismos, cria a necessidade de sistematizar as informações já existentes quanto aos princípios de seu funcionamento e quanto às novas possibilidades de análise molecular do DNA que se abrem com o seu uso.

Apresenta-se nesta Dissertação, inicialmente, uma revisão de literatura, que vem no sentido de possibilitar a exploração desta técnica em toda sua potencialidade e considerando seus limites.

A seguir, descreve-se a utilização do equipamento CHEF na análise genética molecular de uma linhagem de *Aspergillus nidulans* transformada geneticamente.

Para a espécie *Aspergillus nidulans*, foram determinados os parâmetros de eletroforese em campo pulsado que permitem a separação de seus cromossomos em seis bandas, em gel de agarose (BRODY & CARBON, 1989), tornando possível, por meio de análise de Southern (SOUTHERN, 1975), localizar fisicamente DNA exógeno que se tenha integrado aos cromossomos por algum processo de transformação.

O uso de biobalística, para transformação de células intactas, é uma alternativa aos métodos de transformação de protoplastos, pela sua rapidez e facilidade. No caso de *Aspergillus nidulans*, a possibilidade de

transformação de conídios, que são uninucleados, apresenta ainda outra vantagem sobre o uso de protoplastos, que geralmente são multinucleados: na análise genética dos transformantes obtidos, espera-se a formação de número muito menor de colônias heterocarióticas quando as células transformadas são uninucleadas.

Numa primeira tentativa de transformar *Aspergillus nidulans* por biobalística, conídios de uma linhagem que necessita da presença de arginina no meio para se desenvolver foram bombardeados com plasmídios híbridos (pFB39), contendo o gene *argB* selvagem de *Aspergillus nidulans*, que confere prototrofia quanto à produção do aminoácido arginina.

Para analisar as colônias que se desenvolveram no meio seletivo, além dos métodos consagrados da genética clássica (PONTECORVO, 1953) a análise molecular do DNA foi feita usando a técnica de SOUTHERN (1975) e eletroforese em campo pulsado. A análise conjunta dos resultados, obtidos por meio dos vários procedimentos, confirmou a ocorrência de transformação por integração homóloga de um plasmídio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Eletroforese em campo pulsado

Primórdios da eletroforese

O desafio que geneticistas e outros pesquisadores enfrentam atualmente, para conseguir a separação de moléculas de DNA de alto peso molecular, é mais um capítulo na história da "análise de misturas". A separação de substâncias tem sido feita com base em diferenças nas suas propriedades físicas ou químicas como: cor, ponto de fusão, solubilidade, densidade, etc. Variação no comportamento eletroforético também pode separar moléculas, em determinadas condições.

O termo eletroforese foi introduzido para designar a migração de partículas coloidais em um campo elétrico. "Phoresis", em grego, é a ação de levar. Inicialmente, eletroforese foi empregada no estudo de íons de baixo peso molecular. Posteriormente, quando se iniciaram estudos sobre o comportamento eletroforético de moléculas maiores, como proteínas, enzimas ou ácidos nucleicos, sugeriu-se a diferenciação entre os termos ionoforese e eletroforese, em que o primeiro seria restrito aos pequenos íons e o segundo às grandes moléculas. Atualmente, no entanto, não se faz este tipo de diferenciação e eletroforese tem uso geral (TISELIUS, 1959).

Da simples aplicação de uma corrente elétrica à uma solução, promovendo o acúmulo de íons junto

aos eletrodos, até os equipamentos mais sofisticados disponíveis atualmente, algumas alterações foram fundamentais, do ponto de vista da separação de moléculas de DNA por meio de eletroforese. A primeira mudança diz respeito à natureza do meio em que se processa a migração eletroforética.

Em meio líquido, mesmo com gradiente de densidade, a mobilidade das moléculas de DNA é independente de seu peso molecular (OLIVERA et al., 1964). Somente com a introdução de suportes sólidos ou semi-sólidos como os géis de ágar, agarose ou poliacrilamida, tornou-se possível a resolução das moléculas em função de seu tamanho. Migrando através da trama dos géis, as moléculas que se separam durante o processo podem distribuir-se em zonas (bandas) fisicamente discretas, separadas por espaços vazios. Este tipo de eletroforese foi denominado eletroforese de zona (BIER, 1959; KUNKEL & TRAUTMAN, 1959).

Géis de agarose e poliacrilamida são utilizados para eletroforese de DNA. Quando se trata de separar moléculas de alto peso molecular, a agarose oferece melhores resultados, visto que em concentrações adequadas apresenta maior diâmetro médio dos poros.

Agarose é um polímero cuja unidade é a agarobiase, um dímero de D-galactose e L-galactose, ligados por uma ponte anidra. É encontrada na parede celular de alguns gêneros de algas vermelhas marinhas, ou sinteti-

zada artificialmente. Em altas temperaturas, as moléculas se comportam, em solução, como aglomerados de movimentação livre. Na medida em que se reduz a temperatura, formam-se estruturas helicoidais que, no estado de gel, associam-se em feixes (KIRKPATRICK, 1990).

SERWER & HAYES (1986), mostraram que há uma relação linear entre concentração de agarose no gel e diâmetro de poros (no intervalo de concentração entre 0,2% e 1,3%), dada por:

$$P_x = 112 A^{-0.80} \quad (1)$$

em que A é a concentração de agarose e P_x o diâmetro dos poros. Para um gel com 0,8% a 1,2% de agarose, o diâmetro dos poros está ao redor de 130 nm.

Os experimentos iniciais com eletroforese de DNA mostraram que há um limite máximo de resolução, a partir do qual a mobilidade das moléculas não é mais função de seu tamanho e todas migram juntas. Este limite está relacionado ao diâmetro dos poros do gel, ao diâmetro das moléculas durante a migração e ao próprio processo de separação.

Em géis com a concentração normalmente empregada, entre 0,6% e 1%, o limite máximo de resolução não passa de 20 a 30 kb. Tentativas foram feitas no sentido de ampliar esta faixa para moléculas maiores, principalmente reduzindo a concentração de agarose. No entanto não foi possível, no limite, resolução de moléculas com

mais de 700 kb (FANGMAN, 1978; SERWER, 1980; SERWER, 1981).

A invenção da eletroforese em campo pulsado

O DNA em solução, sem campo elétrico, apresenta-se em conformações dinâmicas que se alternam constantemente e aleatoriamente, em movimentos brownianos, passando de esferas compactas para elipsóides ou bastões flexíveis (Figura 2.1, YANAGIDA et al., 1982).

Sob a ação de uma força externa, como um fluxo da solução, as moléculas adotam formatos extremamente esticados (YANAGIDA et al. 1982). A introdução de um campo elétrico faz com que as moléculas migrem no sentido do polo positivo, apresentando a mesma alternância de conformações.

O efeito dos obstáculos, representados pelas tramas de um gel, na mobilidade eletroforética das moléculas, foi comparado à ação de uma peneira (CANTOR & SCHIMMEL, 1980 *apud* SCHWARTZ & CANTOR, 1984). Quanto maior a molécula, maior a dificuldade para atravessar o gel. Este peneiramento ocorreria na fração de moléculas cujo diâmetro médio não ultrapassasse o diâmetro dos poros do gel.

A prevalecer este modelo, porém, não haveria movimentação das partículas maiores que os poros. O que se observa, no entanto, é que estas partículas migram, de modo geral, mas não há separação por tamanho, pois mi

Figura 2.1 Representação esquemática da conformação das moléculas de DNA em solução (YANAGIDA et al., 1982).

gram todas a uma mesma velocidade.

Outro modelo foi proposto para explicar este segundo tipo de movimentação: o modelo da reptação, proposto por deGENNES em 1971 (*apud* LERMAN & FRISCH, 1982) para explicar a movimentação de grandes polímeros confinados em um trançado relativamente imóvel. Reptação refere-se à movimentação dos répteis: é o ato de arrastar-se.

Segundo este modelo, as grandes moléculas assumiriam uma orientação no sentido do campo elétrico, se esticariam e se movimentariam dentro de uma rede de poros, como se estivessem dentro de um tubo. A extremidade líder desta movimentação abriria novos caminhos no emaranhado do gel (Figura 2.2, HOLZWARTH et al., 1987).

Além destes elementos teóricos, os resultados experimentais obtidos por KLOTZ & ZIMM (1972), usando a técnica da deformação viscoelástica, contribuíram para a invenção do método baseado em eletroforese em campo pulsado como forma de separar moléculas de alto peso molecular. Estes autores promoveram a deformação viscoelástica de moléculas de DNA em solução livre, causando uma perturbação (esticamento) na sua configuração normal, globular. Demonstraram que, uma vez suspensa a causa da perturbação, as moléculas voltavam à sua conformação original. Este tempo de relaxamento, era diretamente proporcional ao tamanho das moléculas.

Com base nesta idéia, de que o tempo de

Figura 2.2 Representação esquemática da conformação de moléculas de DNA em gel de agarose, sob ação de um campo elétrico. Modelo da reptação (HOLZWARTH et al., 1987).

reorientação está relacionado com o tamanho da molécula, experimentou-se a estratégia de desorganizar a orientação estabelecida pela influência de um campo elétrico (esticamento) e forçar as moléculas a processos de reorientação. Para isto, desenvolveu-se um sistema de eletroforese, tal que, após um certo tempo de corrida (pulso), a direção do campo elétrico era alterada, forçando as moléculas a migrar em nova direção (SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

As moléculas grandes, que migram segundo o processo de reptação, deveriam se reorientar, quando da alteração do campo elétrico, até adotar novamente a conformação esticada, no sentido do novo campo, que permitiria sua passagem pelos poros do gel. O tempo dispendido neste processo de reorientação seria proporcional ao tamanho destas moléculas, fazendo com que as maiores se atrasassem e as menores se adiantasse, havendo, portanto, separação (SCHWARTZ et al., 1982; SCHWARZ & CANTOR, 1984).

Este processo foi denominado eletroforese em gel em campo pulsado (em inglês: "Pulsed-Field Gel Electrophoresis" - PFGE).

Os primeiros equipamentos para eletroforese em campo pulsado

Vários modelos de equipamento foram construídos para permitir a alternância de campos elétricos. Nos primeiros modelos, o padrão de bandas no gel ostentava

grandes distorções, que dificultavam a interpretação dos resultados, mas que foram sendo corrigidas por modificações introduzidas nos novos protótipos.

O arranjo dos eletrodos, adotado inicialmente, está representado na Figura 2.3 (SCHWARTZ et al., 1982). São 2 pares de eletrodos lineares, dispostos perpendicularmente. As amostras de DNA eram colocadas em canaletas alinhadas com um dos anodos. A movimentação das moléculas, resultante da alternância dos dois campos, era aproximadamente na diagonal.

Neste tipo de equipamento, a passagem de corrente através dos eletrodos desligados (enquanto o campo elétrico era formado pelo outro par de eletrodos), causava distorções nas bandas, visto que a condutividade elétrica dos fios de platina é muito maior que a condutividade da solução. O problema foi solucionado substituindo-se os fios contínuos de platina por eletrodos pontuais, ou com poucos centímetros de comprimento, separados por diodos, que impedem a passagem de corrente entre eletrodos vizinhos. (Figura 2.4, CANTOR, 1988; SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

Outra fonte de distorções, a elevada temperatura produzida pelas altas voltagens aplicadas (100V a 300V), foi eliminada com o uso de sistemas de circulação do tampão através de serpentinas de refrigeração (Figura 2.5, CARLE & OLSON, 1984; CHU et al., 1986). A disposição

Figura 2.3 Ilustração esquemática de eletroforese em gel, com gradiente de campo pulsado, usando campos elétricos não homogêneos, como se fossem gerados pelos eletrodos representados na figura. (a, b) Molécula de DNA imediatamente antes e 20 segundos após a aplicação de um campo horizontal; (c) e após 20 segundos de campo vertical (SCHWARTZ et al., 1982).

Figura 2.4 Duas configurações que proporcionam excelente desempenho em eletroforese em gel em campo pulsado não homogêneo, em uma ampla gama de tempos de pulso e forças de campo elétrico. (A) Anodo duplo e denso arranjo de catodos. (B) Anodo único e apenas três catodos (CANTOR et al., 1988).

Figura 2.5 Diagrama esquemático do equipamento para eletroforese em gel. Apenas a região mostrando a cuba para o gel, a localização dos eletrodos e o próprio gel estão desenhados em escala (CARLE & OLSON, 1984).

dos eletrodos em ângulo de 45° em relação ao gel, melhorou a estética das bandas, com as moléculas migrando perpendicularmente às canaletas.

A principal causa das distorções, porém, só foi eliminada com uma mudança na concepção do processo responsável pela resolução das moléculas por PFGE. Acreditava-se que a separação das moléculas só ocorreria em campos elétricos não homogêneos. (SCHWARTZ & CANTOR, 1984; SMITH & CANTOR, 1987; CARLE & OLSON, 1986).

Nos modelos apresentados acima, observa-se que anodos e catodos são de tamanhos diferentes, criando campos elétricos não homogêneos. No gráfico da Figura 2.6 (CANTOR et al., 1988), foram plotadas as voltagens medidas em um campo elétrico não homogêneo, produzido por um arranjo de eletrodos similar ao da Figura 2.4.

Sugestivamente, SCHWARTZ & CANTOR (1984) denominaram o sistema de "eletroforese em gel em gradiente de campo pulsado" PFGE (do inglês: "Pulsed-Field Gradient Gel Electrophoresis"). CARLE & OLSON (1984), empregaram o termo OFAGE (do inglês: "Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis" - eletroforese em gel com alternância ortogonal de campo).

A compreensão de que, a par dos gradientes de voltagem, também se estabeleciam gradientes de ângulos entre os campos elétricos, no sentido longitudinal da corrida, sugeriu que a resolução em PFGE estaria associada

Figura 2.6 Potenciais elétricos calculados para a configuração de eletrodos ilustrada na **Figura 2.4**, indicados pelos sinais de + e -. O intervalo de voltagem foi escolhido, arbitrariamente, entre 0 V e 200 V, mas os potenciais variam linearmente para qualquer intervalo de voltagens (CANTOR et al., 1988).

ao ângulo formado entre os campos e n_{a_0} ao fato destes campos não serem homogêneos.

O gráfico da Figura 2.7 (CANTOR et al., 1988), em que são plotados os ângulos formados entre campos elétricos em OFGE, mostra que há um gradiente partindo de 90° , tendendo a 180° . Estes autores, inclusive, criticam o nome de OFAGE, visto que, a despeito da disposição dos eletrodos ser ortogonal, os campos formados não são ortogonais.

A demonstração definitiva de que campos não homogêneos não são necessários para separação das moléculas em PFGE, foi feita por CHU et al. (1986). Um campo homogêneo, por definição, é aquele formado por dois eletrodos de comprimento infinito. Para simular este efeito, os autores criaram equipamentos com eletrodos distribuídos em contorno fechado ao redor do campo elétrico, com circuitos independentes, de forma a aplicar aos eletrodos laterais, potenciais intermediários (Figura 2.8, CHU et al., 1986).

Mesmo eletroforese em campo contínuo, apresenta bandas mais alinhadas, quando há correção das distorções laterais por meio de eletrodos em contorno e também refrigeração do tampão (Figura 2.9, CHU et al., 1986). Este tipo de campo elétrico foi chamado CHEF (do inglês: "Contour-Clamped Homogeneous Electric Field" - campo elétrico homogêneo fixado em contorno).

Figura 2.7 Ângulo calculado entre dois campos elétricos alternados, para a configuração de eletrodos ilustrada na figura 2.4 (CANTOR et al., 1988).

Figura 2.8 Equipamento para alternância de CHEF (do inglês "contour-clamped homogeneous electric fields", campos elétricos homogêneos fixados em contorno). O gel e as configurações de eletrodos estão desenhados em escala. Os eletrodos (fios de platina de 0,03 polegadas de diâmetro) estão imersos em tampão TEB 0,5X (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1,25 mM EDTA, pH 8,3) e conectados por uma série de resistores (820 Ohms e 2 W, para o arranjo quadrado; 470 Ohms e 2 W, para o arranjo hexagonal). A Alternância de orientações são geradas por um "timer" (medidor de intervalo de tempo GraLab, modelo 451) que dirige a alternância de campos. O arranjo hexagonal é mostrado na configuração para um ângulo de reorientação de 120° . O tampão foi mantido resfriado a 9°C , por meio de circulação em tubulação de silicone imersa em água (Banho Maria modelo Haake A81) (CHU et al., 1986).

Figura 2.9 Disposição de eletrodos para eletroforese em campo contínuo, sistema CHEF (do inglês: "contour-clamped homogeneous electric field", campo elétrico homogêneo fixado em contorno) (CHU et al., 1986).

A influência do ângulo entre os campos, sobre o poder de resolução da eletroforese, foi estudada em campos homogêneos e não homogêneos. SMITH & CANTOR (1987) e SOUTHERN et al. (1987), citaram cálculos e observações experimentais em campos não homogêneos, classificando ângulos em torno de 120° como os que proporcionavam maior resolução.

CHU et al. (1986), BIRREN et al. (1988) e CHU & GUNDERSON (1991), demonstraram, em campos homogêneos, que com ângulo de 90° ou ângulos agudos entre os campos, a resolução foi equivalente à obtida em campo contínuo. A resolução foi eficiente com ângulos obtusos, sendo que, para ângulos entre 110° e 140° os resultados foram semelhantes e, dentro desta faixa, aconselharam o uso do menor ângulo possível, pois a separação se daria mais rapidamente.

CARLE & OLSON (1986), utilizando uma cuba para eletroforese convencional, simplesmente invertendo periodicamente a direção do campo (formando campos em 180°) e estabelecendo tempos de pulso para frente maiores que os tempos de pulso para trás, obtiveram resolução de moléculas na faixa de 2 kb a 580 kb. Este sistema foi chamado FIGE (do inglês: "Field Inversion Gel Electrophoresis" - eletroforese em gel com inversão de campo).

Outros sistemas para eletroforese em campo pulsado

O aperfeiçoamento dos sistemas de PFGE se deu com a construção de equipamentos que permitiam cada vez maior controle sobre as variáveis que interferem no processo. Foram aperfeiçoados circuitos eletro-eletrônicos e computadores e câmaras de vídeo foram acoplados para programar e acompanhar a movimentação eletroforética do DNA.

SOUTHERN et al. (1987) construíram um equipamento com dois eletrodos contínuos, fixos e com um gel circular rotativo (Figura 2.10). O ângulo formado entre os campos era de 110° . O sistema foi chamado pelos autores de eletroforese em gel em campo cruzado (CFGE, do inglês: "Crossed Field Gel Electrophoresis"). Posteriormente, outros autores usaram as designações RGE (do inglês: "Rotating Gel Electrophoresis" - eletroforese em gel rotatório) e eletroforese de valsa (do alemão: "Waltzer Electrophoresis").

ROFE (do inglês: "Rotating Field Gel Electrophoresis" - eletroforese em gel em campo rotativo) foi um sistema criado em 1987, com arranjo circular de eletrodos que formavam campos em ângulos variáveis, de 0° até 255° . Neste sistema os eletrodos giram e o gel, quadrado, fica no centro da cuba (ZIEGLER & VOLZ, 1992).

PHOGE (do inglês: "Pulsed Homogeneous Orthogonal Field Gel Electrophoresis" - eletroforese em gel em campo homogêneo pulsado ortogonal). O arranjo cria

Figura 2.10 Esquema do equipamento de eletroforese. A cuba é um quadrado com 27 cm, com eletrodos em cada canto. O gel circular (22 cm de diâmetro) é apoiado em uma cuba rotativa, impulsionada por baixo. As duas posições das amostras no gel durante a corrida estão representadas no desenho. O ângulo formado entre os dois campos a que se submetem as moléculas de DNA é de 110° (SOUTHERN et al., 1987).

campos ortogonais homogêneos. Para haver resolução de moléculas grandes é preciso utilizar 4 campos em 4 direções (BANCROFT & WOLK, 1988).

O sistema PACE (do inglês: "Programmable Autonomously Controlled Electrode - eletrodo programável controlado autonomamente, BIRREN et al., 1988) é um derivado do CHEF, em que cada eletrodo pode ser controlado individualmente durante toda a corrida, possibilitando constante alteração de ângulo, voltagem e frequência dos pulso elétricos.

O sistema VACHEF (do inglês: "Variable-Angle Contour-Clamped Homogeneous Electric Field" - campo elétrico homogêneo fixado em contorno com ângulo variável, é uma alternativa mais barata do tipo PACE, por dispensar amplificadores operacionais de alta voltagem (CHU & GUNDERSON, 1991).

ST/RIDE (do inglês: "Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion Decussate Electrophoresis" - eletroforese cruzada com inversão simultânea tangencial/-retangular), um sistema de eletroforese em gel em campo pulsado tridimensional com ângulo variável. O gel é posicionado na vertical, com um campo constante no plano do gel e campos ortogonais alternados produzidos por eletrodos posicionados perpendicularmente ao plano do gel (KÖLLER & SIM, 1991).

McGREGOR & YEUNG (1992) descrevem uma va-

riação do sistema CHEF, em que os parâmetros podem ser alterados durante a corrida, em função do posicionamento das bandas que são observadas periodicamente por câmara receptora de imagens, produzidas por fluorescência de Lexotan, por reflexão de luz UV.

As novidades foram no sentido de estabelecer diferentes estratégias para as corridas, sempre tentando a separar maiores moléculas em menor tempo.

Padrão geral de mobilidade eletroforética e inversão de bandas

O gráfico da Figura 2.11, foi feito por VOLLRATH & DAVIS (1987) com dados obtidos na separação de DNA de cromossomos inteiros de *S. cerevisiae* e de concatâmeros de DNA do fago Lâmbda. Denominaram: região 1, de boa resolução, região 2, de resolução reduzida, região 3, de máxima resolução e região 4, de pouca ou nenhuma resolução (também chamada: zona de compressão - BANCROFT & WOLK, 1988).

SANSEAU et al. (1990) apresentaram um gráfico (Figura 2.12) com 5 zonas distintas obtidas em 2D-PFGE, incluindo zona de mobilidade zero e de inversão. 2D-PFGE (do inglês: "Two Dimensional Pulsed Field Gel Electrophoresis" - eletroforese em gel em campo pulsado bi-dimensional) é obtida em duas etapas: inicialmente o DNA é submetido a migração em OFAGE e a seguir o gel é virado

Figura 2.11 Quatro regiões de resolução em eletroforese em gel em CHEF alternante. A mobilidade foi calculada em relação ao monômero de DNA de fago Lâmbda (48,5 kb) para facilitar a comparação entre géis. As setas à direita do gráfico indicam a extensão aproximada das 4 regiões para a curva de 80 segundos de tempo de pulso (VOLLRATH & DAVIS, 1987).

Figura 2.12 Interpretação esquemática da migração observada com concatâmeros Lâmbda em 2D-PFGE (eletroforese em gel em campo pulsado em duas dimensões) (SANSEAU et al., 1990).

perpendicularmente e submetido a FIGE.

Um inesperado efeito de inversão de bandas foi observado em FIGE: moléculas de maior peso molecular migravam mais rapidamente que moléculas de peso molecular menor. O gráfico da Figura 2.13 (CARLE, 1992), relaciona o tamanho das moléculas com a sua mobilidade, evidenciando quatro diferentes padrões de migração: na zonas B, C e D, a migração é inversamente proporcional ao tamanho das moléculas, conforme esperado, mas na zona A, ocorre o fenômeno da inversão.

Também em PFGE com campos transversais foi detectado o fenômeno da inversão, mas de modo menos acentuado (SCHWARTZ & CANTOR, 1984). LÖBRICH et al. (1993), mostraram que em CHEF, para dadas condições, há inversão na faixa de 1,6 Mb e 2,2 Mb, podendo inverter-se no gel, por exemplo, a posição dos 2 cromossomos maiores de *S. cerevisiae*.

Parâmetros que influenciam a eletroforese

A influência de diversos parâmetros no perfil da resolução eletroforética foi examinada e alguns se mostraram mais decisivos que outros. De modo geral, há interação dos vários parâmetros.

Tempo de pulso

SCHWARTZ et al. (1982), com dados de ele-

Figura 2.13 Representação geral da relação entre tamanho das moléculas e mobilidade, em FIE. O ponto 4 representa o tamanho correspondente à ressonância, para o regime de pulsos empregado (CARLE, 1992).

troforese em campos não homogêneos, já observaram que, aumentando os tempos de pulso, entre 1 e 100 segundos, a região de máxima resolução podia ser deslocada para faixas de moléculas cada vez maiores.

SMITH & CANTOR (1987), utilizando OFAGE, seja com apenas um, ou com os dois campos não homogêneos, demonstraram que o tempo de pulso ótimo para fracionamento é diferente para cada faixa de tamanho das moléculas.

SOUTHERN et al. (1987), separando por OFAGE oligômeros de DNA do fago Lâmbda, elaboraram gráfico plotando dados de mobilidade de moléculas de vários tamanhos em função dos tempos de pulso (Figura 2.14). A interpretação que fizeram dos resultados obtidos nos seus próprios experimentos e no de outros autores, foi de que o fator realmente determinante seria o tempo total de corrida e não o tempo de pulso. Esta interpretação, no entanto, não se mostrou consistente e não foi retomada posteriormente.

BIRREN et al. (1988), usando PACE, com ângulo de 120° entre campos, separando concatâmeros de DNA de fago Lâmbda entre 50 kb e 1000 kb e DNA de cromossomos de levedura, com pulsos de 30 s, 90 s e 120 s, mostraram que, aumentando o tempo de pulso acima do mínimo necessário para separação, a velocidade das moléculas não se alterou. O gráfico da Figura 2.15 relaciona tamanho de molécula com mobilidade, em função de 10 tempos de pulso.

MATHEW et al. (1988b), separando moléculas

Figura 2.14 Gráfico plotando dados de mobilidade de moléculas de vários tamanhos em função de vários tempos de pulso, em OFAGE (SOUTHERN et al., 1987).

Figura 2.15 Velocidade de moléculas de DNA de 50 a 100 kb em diferentes tempos de pulso. Todos os dados provêm de géis de agarose (1%) em eletroforese a 6 V/cm a 13 °C. Os números indicam os intervalos de pulso em segundos (BIRREN et al., 1988).

com peso molecular entre 50 kb e 1000 kb, em OFAGE, mostraram deslocamento das zonas de resolução em gráficos de mobilidade/tamanho de molécula, em função da duração dos pulsos de 50 s até 400 s. Observaram uma mudança de inclinação das curvas, indicando que moléculas de tamanhos diferentes apresentam respostas diferentes em relação a alterações no tempo de pulso.

As informações levantadas sobre as zonas de ótima resolução para cada faixa de tamanho das moléculas, sugeriram a alteração do tempo de pulso durante as corridas, de modo a deslocar constantemente a resolução, abrangendo todas as faixas de tamanho de DNA presentes na amostra (mistura) inicial. A duração dos pulsos vai aumentando (ou diminuindo) gradualmente, cada pulso sendo ligeiramente diferente do anterior. Este sistema foi chamado de rampa, e pode ser aplicado tanto para tempo de pulso como para voltagem.

Os gráficos da Figura 2.16 (MAULE & GREEN, 1990) mostram que é possível estabelecer uma distribuição monotônica das moléculas de 90 kb a 1125 kb, por meio de rampas logarítmicas e/ou exponenciais de tempos de pulso, em CHEF.

Porosidade do gel e outros efeitos relacionados à agarose

VOLLRATH & DAVIS (1987), trabalhando com DNA de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* mos-

Figura 2.16 Os gráficos mostram a relação entre tamanho de molécula (eixo vertical) e mobilidade relativa (eixo horizontal) para quatro regimes de campo pulsado e para moléculas na faixa de 90 kb e 1125 kb. As mobilidades foram medidas em relação ao menor cromossomo de levedura (90 kb), que aparece no ponto mais à direita em cada gráfico. Os regimes de campo pulsado em cada caso são: (a) pulsos fixos de 90 segundos durante 48 horas, (b) rampas lineares de pulsos de 70 e 120 segundos durante 48 horas, (c) pulsos fixos de 70 segundos durante 27 horas, seguidos de pulsos fixos de 120 segundos durante 21 horas, (d) rampas exponenciais de pulsos de 70 a 95 segundos durante 24 horas, seguidos por rampa logarítmica de 95 a 120 segundos durante 24 horas (MAULE & GREEN, 1990).

traram que, mantidas as demais condições, uma redução da concentração de agarose de 1% para 0,6% provocou o deslocamento da região de máxima resolução para faixas de moléculas maiores. Por outro lado, esta redução de porosidade do gel causou aumento da difusão das bandas, diminuindo o poder geral de resolução.

(MATHEW et al. 1988a), mostraram que em OFAGE não houve aumento da resolução com aumento dos poros (diminuição da concentração). O que se observou foi uma alteração na mobilidade geral do DNA (não proporcional ao tamanho das moléculas, na faixa de 48 a 485 kb), para concentrações de agarose entre 0,8 e 1,2 %, com menor mobilidade nas maiores concentrações de agarose. A queda geral da mobilidade em OFAGE foi menor do que na eletroforese em campo constante.

BIRREN et al. (1988), utilizando PACE, mostraram que diferiu o comportamento eletroforético do DNA, com concentrações crescentes de agarose de 0,6%, 1,4% e 1,8%, no sentido de diminuir a velocidade de todas as moléculas, porém, mais acentuadamente, das moléculas maiores. Diminuiu também a espessura das bandas.

Observaram, ainda, uma compensação entre temperatura e concentração de agarose, de tal modo que houve migração equivalente com concentração de agarose de 1,6% a 25°C de temperatura e 1% de agarose a 13°C. Associando os dois efeitos, mostrou-se vantajoso utilizar a

maior concentração de agarose, que diminuiu a espessura das bandas, e a temperatura mais elevada, que acelerou a movimentação do DNA.

CHU & GUNDERSON (1991), mostraram que, com alguns tipos especiais de agarose, é possível usar concentrações mais baixas, como 0,4%, com melhores resultados para altos pesos moleculares (> 2 Mb). Concentrações mais baixas causam muita difusão das bandas, com redução na resolução.

Além da porosidade do gel, outras características da agarose afetam a eletroforese de DNA. A presença de grupos químicos com carga negativa, como os sulfatos, nos dímeros de galactose, cria um fluxo de íons positivos do tampão no sentido do eletrodo negativo, retardando a movimentação, no sentido contrário, dos íons com carga positiva, como o DNA. Moléculas de alto peso molecular são bastante sensíveis a este fenômeno, denominado eletroendosmose (KIRKPATRICK, 1990).

STELLWAGEN (1992) e STELLWAGEN & STELLWAGEN (1994), mostraram que a corrente elétrica determina uma orientação estrutural da agarose, paralela ao sentido do campo elétrico. Esta orientação influencia a mobilidade do DNA. Assim como acontece com o DNA, há reorientação das moléculas de agarose na medida em que se alternam os campos. O tempo de reorientação da agarose é relativamente grande e depende da sua concentração.

Um último efeito atribuído à agarose é o enganchamento (em inglês "trapping") do DNA na trama do gel. TURMEL et al. (1990), observaram que moléculas com peso molecular de 1 Mb são muito sensíveis a altas voltagens, sendo impedidas de migrar ou mesmo de sair da canaleta e entrar no gel. Na Figura 2.17 esquematizaram três tipos de obstruções locais, que seriam responsáveis pelo enganchamento do DNA.

Para contornar este problema, normalmente são usadas baixas voltagens e, portanto, longos tempos de pulso e de duração total da corrida, para obter resolução na faixa das moléculas com mais de 1 Mb. Sistemas alternativos, de pulsos reversos, pulsos intermitentes ou de pulsos secundários foram propostos para evitar enganchamento das moléculas extremamente grandes.

LEVENE & ZIMM (1987) mostraram o enganchamento de moléculas circulares DNA em altas voltagens (10 V/cm). Quanto maior o tamanho das moléculas e maior a voltagem, mais intenso foi o enganchamento. Com a técnica de pulsos reversos (1 s para frente e 0,25 s para trás) conseguiram eliminar o enganchamento.

Mostraram também que houve uma gradação no enganchamento: para determinadas combinações de tamanho de moléculas e voltagem, observaram desde a formação de um rastro em toda faixa de migração do DNA, até a imobilidade total do DNA, que não saiu da canaleta.

Figura 2.17 Três tipos de obstrução local, responsáveis pelo enganchamento do DNA na trama do gel (TURMEL et al., 1990).

O sistema de pulsos secundários (ZHANG et al., 1991) consiste em aplicar pulsos curtos no sentido do eixo final da migração, de forma a desenganchar as moléculas de possíveis obstáculos (como se dessem uma ajuda aos movimentos brownianos, que são movimentos térmicos de natureza aleatória).

(ZHANG et al., 1991), mostraram a eficiência do processo na separação de DNA de cromossomos de *S. pombe*, destacando a variação da resposta em função da duração do pulso secundário, da voltagem e da frequência destes pulsos. O resultado foi no sentido de aumentar a mobilidade em geral (reduzindo o tempo total de corrida), a resolução, e a tolerância a altas voltagens: 8,2 V/cm no pulso primário e até 7 V/cm no pulso secundário. Aplicaram os pulsos secundários em OFAGE e em CHEF.

TURMEL et al. (1990), conseguiram bons resultados com campos intermitentes, em que a corrente elétrica era cortada por prazos de cerca de 0,25 s a cada 1 s de pulso efetivo, e com a reversão do campo com pulsos reversos de 0,1 s a cada 1 s.

LAI et al. (1988), usaram campos intermitentes com variados intervalos de relaxamento (campo zero) em PACE, separando DNA de cromossomos de levedura. Mostraram que a faixa de tamanho das moléculas, que tem sua mobilidade afetada pelos intervalos de relaxamento, é variável, na medida em que se muda a duração do relaxa-

mento.

Temperatura

BIRREN et al. (1988), realizaram experimentos em equipamento do tipo PACE, e seus resultados indicaram que, mantidas as demais variáveis, com a elevação da temperatura na cuba de eletroforese na faixa de 4°C a 34°C, aumentou proporcionalmente a velocidade geral de migração do DNA, deslocando-se a região de melhor resolução para um intervalo de moléculas de maior peso molecular, mas com aumento da espessura das bandas, com prejuízo para a acurácia da resolução.

(MATHEW et al. 1988a), analisaram em OFAGE a mobilidade das moléculas em temperaturas de 10°C, 15°C e 20°C. Observaram que o incremento da mobilidade, quando se elevou a temperatura de 15°C para 20°C, foi de 21%. Testando a hipótese de que o aumento da velocidade em altas temperaturas se deveria a uma redução na viscosidade da solução, constataram que, no mesmo experimento, a viscosidade só cresceu 11%. Interpretaram os resultados argumentando que o efeito da temperatura seria mais complexo do que simplesmente a alteração da viscosidade do tampão.

Igualando a viscosidade para as duas temperaturas, com adição de sacarose à solução, obtiveram valores diferentes de velocidade das moléculas de DNA, para situações em que a viscosidade era a mesma mas a tempera-

tura diferente, o que corroborou a hipótese da existência de outros efeitos térmicos interferindo na eletroforese. Sugeriram ocorrência de efeitos microlocalizados da viscosidade ou alterações térmicas nas configurações das moléculas, necessárias à reorientação e movimentação do DNA no gel.

CHU & GUNDERSON (1991), utilizando um equipamento VACHEF, indicaram que, para moléculas maiores que 2 Mb, temperaturas ao redor de 12°C minimizam o aparecimento de rastro na corrida. Sugerem que em temperaturas elevadas podem ocorrer alterações na agarose ou na estrutura do DNA. A mobilidade de moléculas menores é menos afetada pela elevação da temperatura.

Voltagem

VOLLRATH & DAVIS (1987), mostraram que há uma voltagem máxima, acima da qual as moléculas ficam enganchadas no gel e não se separam. Quanto maior a molécula, menor a voltagem que produz este efeito.

BIRREN et al. (1988), em equipamento PACE, aplicando campos elétricos de 3 V/cm, 6 V/cm e 9 V/cm, mostram que quanto maior a voltagem, maior foi a velocidade de todas as moléculas e a zona de melhor resolução deslocou-se para moléculas de maior tamanho. A alteração da voltagem foi compensada com alteração nos tempos de pulso. As menores voltagens produziram melhor resolução,

em vista da menor espessura das bandas.

Mostraram também, separando cromossomos de *Schizosaccharomyces pombe*, que as moléculas maiores, com mais que 3 Mb, são mais sensíveis a diferenças de voltagem do que as menores. Em altas voltagens (4 V/cm) estas moléculas não saíram da canaleta mas, quando se aplicavam inicialmente voltagens mais baixas, elas entravam no gel, e mesmo com aumento posterior de voltagem, ocorria migração. Em campos com 2 V/cm estas moléculas migraram mas só ocorreu separação com 1,5 V/cm ou menos.

MATHEW et al. (1988b), utilizando OFAGE, separaram moléculas de 50 kb a 1000 kb sob diferentes voltagens. Observaram alteração na mobilidade, sem aumento da resolução. O gráfico da Figura 2.18, relacionando mobilidade com tamanho das moléculas, para voltagens de 2,5 V/cm até 12,6 V/cm, mostra que quase não houve mudança nos ângulos das curvas, apenas deslocamento das regiões de resolução.

Presença de brometo de etídio

SOUTHERN et al. (1987), mostraram que a incorporação de brometo de etídio reduziu em até duas vezes a mobilidade de todas as moléculas. A intercalação do brometo de etídio no DNA age no sentido de aumentar o comprimento das moléculas, o que, na opinião dos autores, seria responsável pelas alterações observadas no padrão de

Figura 2.18 Mobilidade do DNA de fago Lâmbda class 57 em função da força do campo elétrico. As zonas de resolução estão indicadas (MATHEW et al., 1988b).

separação, deslocando a região de melhor resolução para moléculas de menor tamanho real.

Concentração de DNA na amostra

DOGGETT, et al. (1992), mostraram que em OFAGE e CHEF, aumento da concentração de DNA (entre 8 e 800 ug/ml de DNA humano clivado) reduziu a velocidade de migração das moléculas, mudando o tamanho aparente dos fragmentos separados em relação aos marcadores de peso molecular usados como referência.

O aumento aparente registrado para os fragmentos maiores (735 kb) foi de 21% e para os menores (70 kb) chegou a 150%, dependendo da configuração dos campos: as alterações foram maiores em OFAGE do que em CHEF.

Para moléculas maiores, os resultados variaram também em função das condições da corrida: fragmentos de 1,8 Mb tiveram aumento aparente de 87% em pulsos em rampa de 3000 s a 5000 s e apenas 35% em rampas de pulsos de 1000 s a 3000 s, contra 100% e 48% observados para fragmentos de 1,2 Mb.

Modelos teóricos da eletroforese em campo pulsado

No decorrer do processo de aperfeiçoamento de eletroforese em campo pulsado, o modelo original de reptação, para explicar a movimentação do DNA, foi aperfeiçoado e, em certa medida, superado.

SOUTHERN et al. (1987), apresentaram um esquema, baseado na teoria da reptação, para descrever o processo de reorientação das moléculas no momento da alteração do campo elétrico (Figura 2.19). Segundo este modelo, durante o pulso elétrico as moléculas adotariam uma conformação completamente esticada, com o movimento liderado por uma das extremidades. No momento da mudança do campo, a extremidade posterior passaria a liderar a migração no sentido do novo campo. Moléculas maiores reiniciariam a migração a partir de pontos mais recuados do que as moléculas menores. A cada ciclo, a distância entre moléculas se ampliaria, resultando em separação.

Este modelo explica alguns aspectos do processo, como a ausência de resolução com ângulos de 90°, ou menores, entre campos. A extremidade líder em um campo poderia continuar dirigindo o movimento no outro campo, eliminando-se o efeito do tamanho das moléculas. No entanto, a prevalecer este modelo, não haveria a resolução observada em FICE.

A concepção de moléculas rígidas e completamente esticadas, com comprimento constante, limitadas a um tubo sem ramificações (Figura 2.20, VIOVY & DESFONTAINES, 1992), foi sendo mudada. A observação das moléculas em microscopia de fluorescência revelou várias conformações, sob campo contínuo ou pulsado. RAMPINO & CRAMBACH (1991), descreveram o sofisticado equipamento de micros-

Figura 2.19 Modelo do mecanismo de separação de moléculas de DNA: movimento de moléculas durante dois pulsos sucessivos e separação por tamanho, como resultado da alternância da extremidade líder. A molécula de DNA representada aqui como uma linha reta, provavelmente é uma cadeia parcialmente dobrada. a) Duas moléculas, i e j, no final do primeiro pulso. As extremidades líderes estão juntas, enquanto que as extremidades posteriores estão separadas por $h_i - h_j$. Projetada sobre a linha mediana, a separação se torna $(h_i - h_j)\cos\theta$; ($\theta > 45^\circ$). b) No início do segundo pulso, i e j giram suas extremidades posteriores. c) Posições de i e j depois do 2º pulso. d é a distância percorrida pela extremidade dianteira de cada molécula durante um pulso completo (SOUTHERN et al., 1987).

Figura 2.20 A) Representação esquemática da cadeia de DNA (linha cheia) e seu tubo (linhas pontilhadas) no gel (pequenos círculos). B) Mesmo esquema, com uma alça ou hérnia (VIOVY & DESFONTAINES, 1992).

copia acoplado a computador e câmera de vídeo, usado nestas observações.

Uma das limitações da vídeo-microscopia é que seu limite de resolução não permite visualizar a trama formada pela agarose. Sua presença só pode ser inferida pelo comportamento do DNA. DEUTSCH (1988 e 1992) esquematizou as imagens registradas em microscopia.

As Figuras 2.21 e 2.22 referem-se à migração sob campo constante. Notem-se as formas em U e os ciclos de aglomeramento e esticamento (SMITH et al., 1989).

A Figura 2.23 (DEUTSCH, 1992) representa o início da reorientação, com formação de inúmeras ramificações que tendem a se alongar e reduzir em número.

CHU (1991), propôs um modelo em que abandonava várias das premissas básicas da reptação. Sugeriu que as moléculas se comportariam como sacos deformáveis, caracterizados por apresentar uma orientação, uma extremidade líder do movimento e uma certa memória do movimento anterior, ao ser submetida a novo campo elétrico.

Um parâmetro crítico neste modelo é o tempo de reorientação (T_R). A mobilidade das moléculas seria função, fundamentalmente, da relação entre o tempo de reorientação e o tempo de pulso (T_P). A Figura 2.24 (CHU, 1991) ilustra o comportamento de moléculas quando o tempo

Figura 2.21 Movimentação de uma molécula de DNA em um gel. Os parâmetros nesta corrida foram $qEl/k_B T = 42,67$. Os tempos relativos em cada quadro são (A) 100, (B) 105, (C) 110, (D) 112, (E) 114, (F) 116, (G) 118 e (H) 119. A direção do campo elétrico é vertical, para baixo (DEUTSCH, 1988).

Figura 2.22 Para campos muito mais fracos ($qE\ell/k_B T < 5$) a movimentação tem um aspecto diferente, ilustrado nesta figura ($qE\ell/k_B T = 0,604$). Os tempos relativos para cada quadro mostrado são (A) 260, (B) 270, (C) 280, (D) 290, (E) 330, (F) 340, (G) 350 e (H) 360. O campo elétrico é vertical, para baixo (DEUTSCH, 1988).

Figura 2.23 (a) Molécula de DNA movendo-se em um gel sob a influência de um campo E , orientado horizontalmente. As fibras do gel estariam saindo do papel e são representadas por círculos abertos. (b) Depois do campo ser girado em 90° , o DNA começa a se mover para baixo mas é atrapalhado pelas fibras do gel. (c) Em alguns pontos formam-se ramificações (DEUTSCH, 1992).

Figura 2.24 (A) Reorientação ortogonal. Migração de moléculas de DNA de diferentes tamanhos em um campo que é reorientado em ângulo de 90°, com um T_P fixo. Os tamanhos refletem-se em diferenças no T_R . Note-se a migração relativamente rápida da molécula pequena ($T_R = T_P/2$) em relação à molécula intermediária ($T_R' = T_P$). A molécula maior permanece orientada na direção de um dos campos, de modo que sua velocidade de migração é anormalmente alta e inclui um componente lateral. (B) Reorientação em ângulo obtuso. A migração de uma molécula de DNA é mostrada para um ângulo de reorientação de 120°. O novo campo tem um componente de retorno na direção do eixo do campo anterior que leva o DNA a mover-se para trás no início de cada pulso. Isto leva ao retardamento relativo de moléculas maiores, melhorando a resolução para ângulos $> 90^\circ$ (CHU, 1991).

de pulso é igual, metade ou o dobro do tempo de reorientação.

Dados experimentais confirmam a estreita dependência da mobilidade em relação à razão $T_R/T_P = \tau$.

Os gráficos da Figura 2.25 (CHU, 1991) mostram que as curvas de migração em função do peso molecular, para cada tempo de pulso, são perfeitamente agrupadas em um única curva quando se substitui a variável peso molecular, pela razão T_R/T_P (τ).

Modelos matemáticos da eletroforese em campo pulsado

A síntese matemática de todas as informações obtidas experimentalmente, somadas às observações microscópicas, foi tentada por vários pesquisadores. Equações matemáticas, relacionando as variáveis significativas na migração eletroforética, são fundamentais para a elaboração dos programas de computador que definem estratégias adequadas de corrida eletroforética, para resolução de conjuntos específicos de moléculas.

BUSTAMENTE et al. (1993), forneceram um exemplo de equação contemplando as variáveis experimentais que afetam o tempo de reorientação (t_R) das moléculas:

$$t_R = M^a A^{0.5} \eta(T) / E^b \quad (2)$$

em que M é o tamanho da molécula, E é a força do campo elétrico, A é a concentração de agarose, T é a temperatura e η é a viscosidade do tampão. Os valores dos expoentes

Figura 2.25 (A) Dados experimentais em função do tamanho das moléculas de DNA. Dados de corridas em gel com diferentes tempos de pulso, mostraram uma ampla gama de padrões de separação. As bandas invertidas em géis, com pulsos de 180 segundos e 300 segundos de pulso, apresentaram também o fenômeno de espalhamento. As setas indicam pontos usados para estabelecer parâmetros no modelo de saco. DNA cromossômico de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pombe* (0,245 Mb a 5,7 Mb) submetido a eletroforese em campo reorientado periodicamente em ângulo de 120° a 3,1 v/cm em gel de agarose (gradação cromossômica) a 0,4% (BioRad) em TBE a 12°C durante 20 horas (14). (b) Dados experimentais em função de T . Os pontos convergem para um único padrão de separação quando plotados como função de $T = T_r/T_p$. A linha sólida representa a curva universal predita pela Equação 1 (CHU, 1991).

são: $\alpha=1,17$ e $\beta=1,4$ para OFAGE e $\alpha=\beta=1,3$ para FIGE com a razão 3:1 entre tempo de pulso para diante/tempo de pulso para trás.

Esta equação tem limitações óbvias. Por exemplo, ela implica que altas voltagens podem ser usadas para reduzir o tempo de reorientação e, assim, acelerar a separação em PFGE. No entanto, sabe-se que moléculas muito grandes deixam de movimentar-se com voltagens acima de um valor crítico. TURMEL et al. (*apud* BUSTAMANTE et al., 1993), chegaram à seguinte expressão para determinar a voltagem crítica (E_{crit}):

$$E_{crit} = 3/[\ln(3M/2)] \quad (3)$$

em que M (tamanho da molécula) é dado em Mb e E_{crit} é dado em Vcm^{-1}

Outro exemplo de limitação da equação A é que, segundo esta equação, o tempo de reorientação poderia ser reduzido pela diminuição da concentração de agarose. Mas sabe-se que, em concentrações abaixo de 0,5%, os géis tornam-se excessivamente frágeis para manipulação. Concentrações adequadas estão entre 0,6% e 1%.

Com base nestas considerações, foram traçadas curvas de mobilidade em função da razão T_R/T_F (τ), para OFAGE e FIGE (Figura 2.26, BUSTAMANTE et al., 1993) e uma tabela com as condições ótimas para resolução de várias faixas de tamanho de DNA em OFAGE.

Os gráficos da Figura 2.27 comparam dados

Figura 2.26 (a) Curva universal de mobilidade em OFAGE a 120° de Chu (1990, *apud* BUSTAMANTE et al., 1993) mostrando a velocidade relativa de moléculas de DNA para diferentes regiões t_R/t_F . (b) Curva universal para FIGE com razão entre tempos de pulso para frente e para trás de 3:1. Dados de HELLER & POHL (1989, *apud* BUSTAMANTE et al., 1993). t_R determinados pela equação 2 (BUSTAMANTE et al., 1993).

Figura 2.27 (a) Simulação por computador (27) e (b) resultados experimentais (HELLER & POHL (18)) para FICE com tempos de pulso para frente e para trás de 3:1. Os tempos indicados nas curvas são tempos de pulso para frente. As barras de erro representam desvios padrão, obtidos pela distância percorrida por 20 moléculas simuladas, migrando durante 1000 segundos de simulação (HELLER & POHL, 1989, *apud* BUSTAMANTE et al., 1993).

obtidos em simulação feita em computador, com dados obtidos experimentalmente. Como se pode ver, a concordância é grande, o que autoriza o emprego destas simulações.

Perspectivas futuras

O aperfeiçoamento do sistema de eletroforese em campo pulsado, no sentido de produzir bandas nítidas e discretas, foi grande. A comparação das tentativas pioneiras de separar DNA dos cromossomos de *S. cerevisiae* com os resultados obtidos atualmente como rotina, é animadora.

No entanto, ao que parece, foi atingido um limite no poder de resolução da técnica, não sendo possível separar moléculas com peso molecular muito maior que 10 Mb. O isolamento físico, por eletroforese, das longas moléculas de DNA de cromossomos humanos ou de plantas, ainda é inviável.

Uma técnica, recentemente descrita, que permite uma drástica redução do tempo de corrida é a eletroforese de zona capilar (CZE, do inglês: "Capillary Zone Electrophoresis", LIU et al., 1991), associada à eletroforese em gel em campos de direção sinusoidal (BSFGE, do inglês: "Biased Sinusoidal Fields Gel Electrophoresis", SUDOR & NOVOTNY, 1994). Os autores relataram que a resolução de concatâmeros de DNA do fago Lâmbda com peso molecular entre 50 kb e 1000 kb foi realizada em cerca de 3 horas, quando normalmente, em PFGE, demoraria 24 horas.

2.2. Transformação genética

A transformação é uma das mais importantes ferramentas na engenharia genética (COSTA, 1987). O fenômeno foi descoberto em 1928 por Frederick GRIFFITH, em seus trabalhos com *Pneumococos*, observando que uma linhagem de colônias rugosas, não virulenta, exposta a células mortas de uma linhagem virulenta, de colônias lisas, podia transformar-se nesta linhagem virulenta, de colônias lisas.

Estudos posteriores mostrariam que havia um princípio transformante nas células virulentas, responsável pela transformação das células não virulentas (DAWSON & SIA, 1931; SIA & DAWSON, 1931; ALLOWAY, 1932). Fazendo uma análise bioquímica das células da linhagem virulenta, AVERY et al. (1944) mostraram que o princípio transformante era DNA.

Outros passos importantes foram dados até se chegar à tecnologia do DNA recombinante, base da engenharia genética: entre eles, o descobrimento das enzimas de restrição (MESELSON & YUAN, 1968; SMITH & WILCOX, 1970) e dos plasmídios bacterianos, o desenvolvimento de metodologias eficientes para transformação de *Escherichia coli* (MANDEL, M. & HIGA, A., 1970; COSLOY, & OISHI, 1973) e *Saccharomyces cerivisiae* (KHAN, N.C. & SEN, S.P., 1974), o aperfeiçoamento das técnicas de eletroforese, o uso de sondas radioativas e sua hibridação com moléculas fixadas

em membranas (SOUTHERN, 1975).

Uma vez estabelecidos sistemas eficientes de transformação, logo foram usados para isolamento físico de genes. Ligando-se fragmentos de restrição aleatórios de DNA a plasmídios (ou outro vetor) e introduzindo as moléculas híbridas em células hospedeiras (transformação), estes fragmentos serão multiplicados na medida em que cresce o número de células, formando-se colônias (clones).

Além de multiplicados, os fragmentos também são separados uns dos outros, em clones, visto que cada colônia se origina de uma única célula de hospedeiro transformado por um vetor contendo apenas um dos fragmentos de restrição.

A identificação dos clones que contêm um determinado fragmento pode ser feita por hibridação com sonda de DNA ou RNA radiativo. Os primeiros clones assim isolados, no hospedeiro *Escherichia coli*, continham moléculas híbridas de DNA do fago λ (vetor) e rDNA de *Drosophila melanogaster* (GRUNSTEIN & HOGNESS, 1975).

A demonstração de que genes exógenos, ligados a um vetor de clonagem, poderiam ser expressos em hospedeiros adequados (STRUHL, et al., 1976) iniciou uma série extensa de clonagens de genes por complementação de mutações conhecidas. Inicialmente em *Escherichia coli*, STRUHL et al. (1976), usando como vetor o fago λ clonaram o gene *hisB* de *Saccharomyces cerevisiae*. A seguir, em *Sac-*

Saccharomyces cerevisiae, HINNEN et al. (1978), usando como vetor o plasmídio ColE1 de *Escherichia coli*, clonaram o gene *leu2* de levedura. Nestes experimentos não se relata recuperação dos fragmentos clonados, apenas a identificação dos clones do hospedeiro que contêm estes fragmentos. BEGGS (1978), foi o primeiro a descrever a recuperação, em *Escherichia coli*, de plasmídio usado na clonagem (do gene *leu2* de levedura).

Outros usos da transformação em pesquisa genética e biotecnologia têm sido descritos: produção de mutantes por interrupção gênica sítio dirigida ou por substituição de sequências determinadas, estudo de regulação da expressão gênica, uso de vetores de expressão para produção industrial de enzimas e outras proteínas (revisto por FINCHAM, 1989 e TIMBERLAKE & MARSHALL, 1989).

A primeira referência a transformação de fungos filamentosos é de 1973 quando MISHRA & TATUM isolaram clones transformantes de *Neurospora crassa* selecionados por complementação da marca genética *inl*⁻ (inositol). Não usaram vetores para transformação, apenas DNA total de uma linhagem selvagem. Os mutantes *inl*⁻ são mais suscetíveis a transformação por apresentarem certa porosidade da parede celular.

Em 1983, BALLANCE et al. relataram a transformação de *Aspergillus nidulans* pelo plasmídio pFB6, originado da inserção do gene *pyr4* de *Neurospora crassa*

(clonado em *Escherichia coli* por BUXTON & RADFORD, 1983) no plasmídio pBR322.

A transformação de células de fungos e plantas, não pode ser feita seguindo os mesmos procedimentos determinados para bactérias. A simples presença de íons CaCl_2 não induz o estado de competência para transformação nas células, em função da barreira que a parede celular representa para a passagem de DNA. O problema foi inicialmente resolvido digerindo total ou parcialmente a parede celular destas células com enzimas, obtendo-se esferoplastos ou protoplastos que podem ser mantidos intactos na presença de estabilizadores osmóticos. A transformação destas células é feita na presença de polietilenoglicol (PEG), além de outros componentes.

Para evitar a etapa de protoplastização, difícil de se obter em várias espécies, e reduzir a exposição ao PEG, desenvolveu-se a técnica de transformação por eletroporação (MILLER et al., 1988) em que células previamente tratadas com enzimas líticas, tornam-se osmoticamente sensíveis (OSC, do inglês "osmotically sensitive cells") e são submetidas a pulsos elétricos de alta voltagem (2 a 3 kV/cm). GOLDMAN et al. (1990), obtiveram transformantes do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* por meio de eletroporação. Usaram como vetor da transformação o plasmídio pAN7-1, um derivado do plasmídio pUC19 contendo um gene de *Escherichia coli*, que confere resistência a

higromicina, e sequências reguladoras de genes de *Aspergillus nidulans*.

Outra metodologia de transformação de fungos filamentosos foi desenvolvida por BEJ & PERLIN (1989) para aumentar a eficiência de transformação do basidiomiceto *Ustilago violacea*. Protoplastos são expostos ao DNA exógeno na presença de CaCl₂, PEG e acetato de lítio, em condições adequadas. Neste experimento, o vetor de transformação foi o plasmídeo pUCH1, derivado do pUC18, que contém um gene bacteriano que determina resistência a higromicina, associado a uma sequência reguladora do ascomiceto *Cochliobolus heterostrophus*.

Uma nova fase no campo da transformação iniciou-se com a biobalística (balística biológica), uma técnica baseada na aceleração de micropartículas recobertas com DNA, para que atravessem a parede e membrana das células alvo e se alojem no seu interior sem danificá-las. (KLEIN et al., 1987; SANFORD et al. 1987). Inicialmente usado para transformação de células epidérmicas intactas de folha de *Allium cepa*, os equipamentos desenvolvidos para acelerar micropartículas foram empregados com sucesso na transformação de levedura, *Nicotiana tabacum* (KLEIN et al., 1988), bactérias como *Escherichia coli*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia stewartii* e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (SMITH et al., 1992), *Phytophthora spp* (BAILEY, et al., 1993), *Trichoderma harzianum* e *Gliocadium virens*

(LORITO, et al., 1993), *Aspergillus nidulans* (FUNGARO et al., 1995), *Crithidia fasciculata* (VAINSTEIN et al., 1994), *Saccharomyces cerivisiae*, *Saccharomyces pombe* e *Neurospora crassa* (ARMALEO et al., 1990), *Botryotinia fuckeliana* (HILBER et al., 1994).

A biobalística permite que se transforme também mitocôndrias e cloroplastos. JONHSTON et al. (1988) transformaram mitocôndrias mutantes de *Sacharomyces cerivisiae*, portadoras de uma deleção no gene *oxi3*, que codifica para um subunidade da citocromo oxidase, impedindo completamente a atividade respiratória. A introdução de plasmídeo com o gene selvagem através de bombardeamento de micropartículas de tungstênio reverteu o fenótipo mutante. BOYNTON et al. (1988) transformaram cloroplastos de *Clamydomonas reinhardtii* por biobalística, obtendo transformantes estáveis.

Transformação com vetores de replicação autônoma

Na transformação de bactérias, com vetores nativos de bactérias ou versões modificadas destes vetores (plasmídios, cosmídios), o DNA introduzido na célula não se integra ao cromossomo e se replica de maneira autônoma. Isto se deve a sequências que servem como origem de replicação, dando estabilidade ao vetor.

Em células de eucariotos a ocorrência de plasmídios naturais é rara e os plasmídios bacterianos não

se replicam de maneira autônoma quando introduzidos nestas células. Em *Saccharomyces* detectou-se a presença de plasmídios mitocondriais em várias espécies, sendo que plasmídios derivados de *S. cerevisiae* têm sido usados como vetores de transformação com replicação autônoma em levedura.

Além destes plasmídios naturais, clonaram-se várias sequências cromossômicas de levedura que têm a propriedade de, incorporados a plasmídios, torná-los auto-replicativos ainda que não totalmente estáveis. São as sequências ARS (do inglês "autonomous replication sequence", STINCHCOMB et al., 1979).

Em fungos filamentosos foram relatadas várias tentativas de construção de vetores auto-replicativos. BUXTON & RADFORD (1984), tiveram pouco sucesso em isolar ARS de *Neurospora crassa*. BALLANCE & TURNER (1985), isolaram de *Aspergillus nidulans*, uma sequência *ans 1* que aumenta a frequência de transformação neste fungo, mas aparentemente isto não ocorre devido a replicação autônoma do plasmídio que a contém mas por favorecer a transformação integrativa. TSUKUDA et al. (1988) e SAMAC & LEONG (1989) construíram vetores que são aut-replicativos em *Ustilago maydis*. GEMS et al. (1991) isolaram uma ARS em *Aspergillus nidulans*. KISTLER & BENNY (1992), descrevem a construção de um plasmídio auto replicativo em *Nectria haematococca* e em *Fusarium oxysporium*.

Transformação de levedura com vetores integrativos

Em seu artigo pioneiro, HINNEN et al. (1978) demonstraram que a transformação de uma linhagem mutante *leu2* de *S. cerevisiae* por um plasmídio contendo o gene *LEU2*. Por análise de fragmentos de restrição do DNA das células transformantes, distinguiram três tipos de integração das sequências usadas para transformação (Figura 2.28, HINNEN et al., 1978).

O primeiro tipo de transformante continha os dois alelos, *LEU2* e *leu2* arranjados em tandem, separados pelo restante das sequências plasmidiais, possivelmente resultando da ocorrência de uma única permuta na região de homologia entre os genes. Segundo FINCHAM (1989), este tipo de evento poderia ser chamado de integração homóloga aditiva.

O segundo tipo de transformante não apresentava alteração nas sequências vizinhas ao gene *leu2* mas continha plasmídio(s) inteiro(s) integrado(s) em algum outro sítio do genoma. FINCHAM (1989) sugere o termo ectópico para designar este tipo de integração. A integração, nestes casos, foi atribuída a permuta simples entre sequências do plasmídio e sequências não homólogas do cromossomo do fungo.

Em trabalhos posteriores, porém, estas integrações ectópicas, em levedura, foram atribuídas a recombinações homólogas entre sequências do DNA transfor

Figura 2.28 Interpretação esquemática dos eventos de integração, proposta para transformantes dos tipos I, II e III. Cada tipo de evento de integração (à esquerda) dá origem a uma estrutura cromossômica (no centro) que pode ser visualizada por hibridação de DNA de pYleu10 e ColEI com DNA de transformantes digerido com a enzima de restrição HindIII (à direita). As setas representam sítios de restrição de HindIII. Tipo I: integração do plasmídeo pYleu10 no cromossomo III em uma sequência complementar à sequência de levedura situada no plasmídeo. Tipo II: integração do plasmídeo pYleu10 em uma posição não ligada geneticamente à região leu2 do cromossomo III. Tipo III: integração de sequências de DNA de levedura do plasmídeo pYleu10 na região leu2 por meio de um evento de permuta dupla. Estes diferentes eventos de integração levam aos padrões de bandas previstos quando DNA destas linhagens é clivado por HindIII e hibridado com DNA de pYleu10 ou ColEI. Estes padrões hipotéticos de hibridação coincidem com os padrões realmente obtidos (HINNEN et al., 1978).

mente que existiriam também dispersas nos cromossomos da levedura. Sabe-se, por exemplo, que logo a montante do gene *LEU2* há uma cópia da sequência terminal do transposon Tyl e um gene para tRNA de leucina. Cerca de 100 cópias da sequência do transposon estão dispersas no genoma de *S. cerevisiae* e o gene para o tRNA também está repetido várias vezes. Ao que parece, todas as integrações de DNA nos cromossomos de *S. cerevisiae* se dão por homologia.

No terceiro tipo de evento descrito por HINNEN et al. (1978), não se detectava nenhuma alteração no padrão de restrição do DNA ou aquisição de sequências mas apenas a substituição de *leu2* por *LEU2*. Não se poderia atribuir o surgimento destes mutantes a reversões gênicas espontâneas, visto que só foram encontrados em células expostas ao DNA dos plasmídios. A explicação sugerida foi de que ocorreriam interações homólogas entre as sequências e conversão gênica, sem permuta (FINCHAM, 1989).

Experimentos de ORR-WEAVER et al. (1981) e ORR-WEAVER & SZOSTAK (1983a) esclareceram alguns aspectos da possível origem dos eventos homólogos do tipo 1 (adição) e do tipo 3 (substituição). Primeiramente mostraram que a frequência de surgimento de transformantes do tipo 1 poderia ser aumentada quase 50 vezes clivando os plasmídios dentro do gene *LEU2*. A frequência de transformação não se reduzia quando as duas fitas do DNA eram clivadas retirando parte do gene, desde que se mantivessem as se-

quências do gene selvagem correspondentes à mutação do gene *leu2*. Estes transformantes continham uma cópia completa de cada alelo, separadas pelas demais sequências do plasmídio. O alelo selvagem provavelmente era reconstituído por um sistema de reparo, usando como molde as sequências do alelo presente no cromossomo da levedura, havendo em seguida recombinação simples e integração do plasmídio ao cromossomo. Este experimento levou à proposição de um modelo em que a recombinação se daria pelo processo de quebra nas duas fitas e reparo. (ORR-WEAVER & SZOSTAK, 1985).

Em outro experimento, em que os plasmídios continham o gene *LEU2* e o gene *HIS3* e eram clivados dentro de um ou outro marcador, ORR-WEAVER et al. (1981), demonstraram que a integração se dava predominante no loco homólogo ao gene clivado.

O envolvimento do processo de quebra nas duas fitas e reparo, no surgimento de transformantes do tipo 3 (substituição), foi sugerido por ORR-WEAVER & SZOSTAK (1983), em função dos resultados obtidos por transformação com plasmídio auto-replicativo portador das marcas *LEU2* e/ou *HIS3*. Quando parte do gene marcador do plasmídio era excisado, obtinha-se cerca de 50% de transformantes com o plasmídio integrado e 50% com plasmídios não integrados. O que se concluiu é que quebra e reparo estavam associados a permuta subsequente em 50% dos casos e que,

se esta fosse a maneira generalizada de interação entre um gene selvagem num vetor de transformação e sua contrapartida no cromossomo da célula receptora, provavelmente os transformantes do tipo 3 deveriam surgir de uma quebra nas duas fitas do cromossomo (e não do plasmídio) seguida de reparo mas sem permuta. Já no caso dos transformantes do tipo 1 (eventos aditivos), a quebra poderia ocorrer tanto no cromossomo como no plasmídio, seguida de reparo e permuta, resultando no arranjo em tandem dos dois alelos, a menos que, no momento do reparo houvesse conversão gênica, estando representado apenas um destes alelos no cromossomo, em duas cópias (FINCHAM, 1989).

Além dos eventos de integração de um único plasmídio têm sido descritas integrações, em tandem, de múltiplas cópias dos vetores. Estes arranjos podem ocorrer com a formação inicialmente de oligômeros de plasmídios, por recombinação homóloga e posterior integração aos cromossomos, ou por vários ciclos de integração de plasmídios monoméricos (FINCHAM, 1989). ORR-WEAR & SZOSTAK (1983b), obtiveram forte evidência para o segundo tipo de evento em *S. cerevisiae*.

Se todas as transformações em *S. cerevisiae* ocorrem por quebra de DNA em fita dupla seguida de reparo ou se ocorre também quebra em fita simples e transferência, como propõe o modelo mais aceito de Meselson e Rad-ding (1977), é um ponto em discussão.

Transformação de fungos filamentosos com vetores integrativos

Em fungos filamentosos foram descritos transformantes dos três tipos sugeridos por HINNEN (1978), com frequências diferentes para as várias espécies transformadas e para diferentes genes na mesma espécie (FINCHAM, 1989).

Em *Aspergillus nidulans*, WERNARS et al. (1986) mapearam a integração do gene marcador *amdS*⁺ em vários cromossomos diferentes em diversas colônias transformadas. TILBURN et al. (1983), detectaram integração homóloga aditiva no loco *amdS*, parcialmente deletado no fungo receptor, ou quando rDNA foi incorporado ao vetor, em genes para rDNA.

YELTON et al. (1985), selecionaram 10 transformantes *trpC*⁺ obtidos com plasmídio circular e 5 obtidos com plasmídios linearizados por clivagem dentro do gene marcador. Sete dos primeiros transformantes resultaram de interação entre o gene marcador e o loco correspondente no cromossomo (5 adições e 2 substituições) e três deveram-se a integração ectópica. No segundo grupo de transformantes 4 foram adições homólogas e 1 integração ectópica.

A linearização não alterou a frequência total de transformantes, diferentemente do observado em levedura (ver acima). Seis das nove integrações com adição

envolveram eventos mais complexos que uma permuta simples e integração do plamídeo completo. A análise de fragmentos de restrição demonstrou que, além deste tipo de integração, pode ter ocorrido integração de mais de uma cópia do plasmídeo no mesmo loco (mas com deleções ou outro tipo de alteração estrutural) ou integração heteróloga em alguns destes transformantes.

DE GRAAFF et al. (1988), obtiveram transformantes usando o gene marcador para piruvato kinase. Dos 13 transformantes analisados, 10 eram homólogos (4 adições e 6 substituições) e 3 eram ectópicos.

WERNARS et al. (1985), obtiveram transformantes *amS*⁺ com grande número de cópias do plasmídeo. A maioria das cópias parecia integrada em tandem em locos ectópicos, possivelmente uma integração ectópica seguida de vários ciclos de integrações homólogas no lugar dos plasmídios já integrados.

Mecanismos de integração

A Figura 2.28 (HINNEN et al., 1978) é uma representação esquemática dos tipos de eventos propostos para transformantes de *Saccharomyces cerevisiae*, dos tipos I, II e III.

TIMBERLAKE (1989), propôs o mesmo tipo de esquema, ligeiramente modificado para transformação em fungos filamentosos (Figura 2.29, TIMBERLAKE & MARSHALL,

Figura 2.29 Inserções cromossômicas marcadas. (A) Disrupção do gene yA por transformação com um fragmento de restrição interno. O evento de recombinação mostrado resulta na formação de uma duplicação de yA de modo que na cópia da esquerda falta a extremidade 3' do gene e na cópia da direita falta a extremidade 5'. (B) Recombinação entre um plasmídeo circular contendo um alelo mutante e o cromossomo contendo um alelo mutante diferente. Apenas recombinações no intervalo entre as duas mutações levam à formação de alelo do tipo selvagem. (C) Recombinação entre um fragmento linear contendo um alelo mutante e o cromossomo contendo um alelo mutante diferente. A permuta da direita pode ocorrer em qualquer lugar na posição distal à mutação (TIMBERLAKE & MARSHALL, 1989).1989).

Figura 2.30 (FINCHAM, 1989, legenda na próxima página).

Figura 2.30 Possíveis mecanismos de transformação. O DNA doador é supostamente um plasmídeo circular com um marcador para seleção (+), distinto do sítio correspondente (-) no cromossomo receptor. A região de homologia entre plasmídeo e cromossomo é indicada pela linha mais grossa. Notar que para a substituição da sequência, o plasmídeo não deve ser circular. (a) Este painel é modificado do modelo geral de recombinação de MESELSON & RADDING (1975). Dois casos são reconhecidos. (i) No primeiro o DNA híbrido não cobre o sítio +/- . Resolução da junção de Holliday por corte e rejunção das fitas não cruzadas (β) leva a "crossing-over" e integração do plasmídeo. (ii) No segundo caso o DNA híbrido cobre o sítio +/- . Com permuta (resolução β da junção de Holliday), há transformação por integração do plasmídeo, desde que a falha +/- não seja corrigida para -/-; se não ocorrer correção +/+, a transformação só será completada depois do ciclo seguinte de replicação. Com resolução da junção Holliday por corte e rejunção das fitas cruzadas (α), haverá transformação por substituição de sequência, desde que a falha +/- não seja corrigida para -/-; se não ocorrer correção para +/+, a transformação só será completada depois de mais um ciclo de replicação de DNA. Note-se que no caso (i), mas não no caso (ii), as mesmas consequências são esperadas se o cromossomo em vez do plasmídeo atuar como um doador de fita única. (b) Este painel é modificado do modelo geral de recombinação por quebra e reparo de fita dupla, de SZOSTAK et al. (1983). Três casos são considerados. (i) O primeiro é uma quebra no plasmídeo que não leva à remoção do sítio +. "Crossing-over" seguido de resolução α/β ou β/α das duas junções de Holliday, leva a integração do plasmídeo. (ii) O segundo caso é uma quebra no cromossomo que não leva à remoção do sítio -. "Crossing-over" (resolução α/β ou β/α) também leva à integração do plasmídeo. (iii) O terceiro caso é uma quebra no cromossomo com alargamento de modo a remover o sítio -. Reparo sem "crossing-over" (resolução α/α ou β/β) leva à conversão por substituição de sequência. Reparo com "crossing-over" (resolução α/β ou β/α) leva à integração do plasmídeo com integração de duas cópias do gene + em tandem. (FINCHAM, 1989).

FINCHAM (1989), apresentou dois modelos para os possíveis mecanismos da estrutura fina da transformação baseada em homologia de sequências (Figura 2.30, FINCHAM, 1989). No primeiro, estão representados os caso de quebra em uma das fitas das moléculas de DNA (modifica-

do de MESELSON & RADDING, 1975). No segundo, o modelo de quebra das duas fitas seguida de reparo (modificado de SZOSTAK et al., 1983).

Outros eventos associados à transformação

Alguns trabalhos têm mostrado que podem ocorrer rearranjos estruturais (deleções ou duplicações) no DNA envolvido na transformação. Tanto no cromossomo receptor de DNA exógeno (KISTLER & BENNY, 1992) como no vetor, seja integrativo (RAZANAMPARANY & BEGUERET, 1988) seja de replicação autônoma (BARNES et al., 1986; PAIETTA & MARZLUF, 1985; WRIGHT et al., 1986).

Outro tipo de alteração é a metilação do DNA, quando se encontra mais de uma cópia de um gene, que normalmente ocorre em cópia única no genoma (BULL & WOOTTON, 1984; FINCHAM, 1989; LORITO et al., 1993).

O DNA amplificado nas células, também pode sofrer alterações por substituições de bases: em *Neurospora crassa*, onde o fenômeno foi descrito, mais de 50% dos pares guanina-citosina são substituídos por adenina-timina, nos produtos meióticos de cruzamentos entre uma linhagem com a amplificação e outra sem a amplificação. Estas substituições de bases e alguns casos de metilação estão associados ao efeito RIP (do inglês: "rearrangements induced premeiotically", FINCHAM, 1989).

Todos estes eventos podem refletir-se no

padrão de bandas, em uma análise de fragmentos de restrição de indivíduos transformantes.

Transformação de fungos por biobalística

Eventos de transformação por biobalística têm sido descritos e aparentemente os tipos de integração observados em transformantes estáveis, não diferem daqueles já relacionados em transformação por outros métodos.

Plasmídios auto-replicativos e plasmídios integrativos transformaram *Saccharomyces cerevisiae* dentro dos padrões já descritos para transformação com PEG, sendo as integrações observadas do tipo homóloga aditiva (ARMALLO et al., 1990). O que surpreendeu nos resultados, foi que não se detectou um significativo incremento na frequência de transformação, quando o vetor foi previamente linearizado, conforme descrito anteriormente por ORR-WEAVER & SZOSTAK (1983a). Os autores sugerem que isto se deve à ruptura dos plasmídios no processo de bombardeamento, tornando-os lineares e por esse motivo a frequência de transformação é equivalente à dos plasmídios clivados previamente. O próprio contato dos plasmídios com as partículas de tungstênio promove uma certa degradação do DNA (LORITO et al. 1993).

S. pombe transformada com plasmídios auto-replicativos resultou em transformantes com plasmídios não integrados ao genoma e transformação de conídios de *Neu-*

rospora crassa apresentou eventos do tipo homólogo e do tipo ectópico (ARMALEO et al., 1990).

BAILEY et al. (1993) transformaram por biobalística quatro espécies fitopatogênicas do gênero *Phytophthora*, usando simultaneamente um plasmídio integrativo com uma marca seletiva de resistência a higromicina e um plasmídio auto-replicativo de expressão do gene GUS. As integrações ocorreram em cópia única, cada transformante com o plasmídio em loco diferente no genoma. Os plasmídios com o gene GUS mantiveram-se na forma autônoma.

LORITO et al. (1993) compararam os processos de transformação por biobalística fusão de protoplastos e PEG para as espécies *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium virens*. Os resultados foram semelhantes, com integração de múltiplas cópias do plasmídio usado como vetor, possivelmente em tandem, e variadas intensidades de metilação. O padrão de restrição do DNA de alguns dos transformantes obtidos por biobalística sugeria, além das integrações em tandem, possíveis inserções de cópia única ou em locos com diferentes regiões flanqueadoras.

HILBER et al. (1994), transformaram conídios de *Botryotinia fuckeliana*, com gene que confere resistência a higromicina. A análise do DNA dos transformantes indicou ocorrência de eventos de integração e os autores sugeriram que isto se deu em um só loco, mas não necessariamente o mesmo para todos os indivíduos.

POLI (1995), analisando transformantes de *Aspergillus nidulans*, detectou transformantes estáveis por integração homóloga (adição e substituição) e ectópica. Observou, inclusive, inserção ectópica do gene marcador sem as sequências bacterianas do plasmídio, em cromossomo diferente da localização normal do gene no genoma do fungo.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Linhagens de *Aspergillus nidulans*

A linhagem MSE (Master Strain E), derivada da linhagem selvagem de *Aspergillus nidulans* isolada por YUILL (1939), é originada dos estoques do Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia, mantidas no Departamento de Genética da Universidade de Sheffield, Inglaterra.

Esta linhagem apresenta marcadores genéticos nos oito grupos de ligação: *suA1adE20*, *yA2* e *adE20* no grupo I, *wa3* no grupo II, *galA1* no grupo III, *pyrG4* no grupo IV, *facA303* no grupo V, *sB3* no grupo VI, *nicB8* no grupo VII e *riboB2* no grupo VIII (Figura 3.1, PASCON, 1994).

As características fenotípicas associadas a estes marcadores são, respectivamente: supressão da mutação *adE20*, conídeos amarelos, requer adenina, conídeos brancos, não se desenvolve em meio contendo galactose como única fonte de carbono, requer piridoxina, não se desenvolve em meio contendo acetato como única fonte de carbono, requer tiosulfato de sódio, requer ácido nicotínico, requer riboflavina.

A linhagem *argB1; pyrG* apresenta os marcadores genéticos *argB1* no grupo de ligação III e *pyrG* no grupo de ligação IV. Esta linhagem requer arginina e ura

O = centrômero

suA1 adE20 = supressor do mutante adE20

wA3 = conídios brancos

galA1 = incapacidade para utilizar galactose

pyroA4 = requer piridoxina

facA303 = incapacidade para utilizar acetato

sB3 = requer tiosulfato

nicB6 = requer nicotinamida

riboB2 = requer riboflavina

bncA1 = produz conídios bi e trinucleados

Figura 3.1 Mapa de ligação e marcadores genéticos da linhagem MSE ("Master Strain E", YUILL, 1939, *apud* PASCON, 1994).

cila para se desenvolver.

3.2 Linhagem de *Escherichia coli*

A linhagem DH5 de *Escherichia coli* apresenta os seguintes marcadores genéticos (SAMBROOK et al., 1989):

supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

3.3 Plasmídios

O plasmídio pUC8 (VIEIRA & MESSING, 1982) pertence a uma série de plasmídios construídos com sítios de clonagem múltiplos. A Figura 3.2 (VIEIRA & MESSING, 1982) apresenta uma mapa genético com as sequências dos sítios de restrição.

O plasmídio pFB39 (BUXTON et al., 1985) é formado pelo vetor pUC8 e o gene *argB* de *Aspergillus nidulans* (Figura 3.3, QUEIROZ, 1993).

3.4 Meios de cultura

Meio completo para *Aspergillus* (PONTECORVO e col., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973).

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g

ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
Ácido nucleico de leveduras hidrolisado	2,5 ml
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Ajustar o pH para 6,8 com NaOH. Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar protegido de luz.

Meio completo para *Aspergillus* suplementado com arginina

Meio completo	200 ml
Arginina	10 mM

Meio de cultura para bactérias Luria-Bertani (LB)

NaCl	10 g
Bacto triptona	10 g
Bacto extrato de levedura	5 g
H ₂ O destilada	1 l

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar protegido de luz.

Figura 3.2 Mapas genéticos de plasmídios pUC. O sítio *TaqI* (4018 pb no mapa do pBR322) serve como referência para os mapas dos plasmídios pUC. Ao lado dos sítios *TaqI* no sítio múltiplo de clonagem, como parte dos sítios *SalI*, apenas um outro sítio *TaqI* (2574) localizado entre os dois sítios *HaeII* (2352 e 2722) é derivado de sequências do pBR322. os diferentes sítios múltiplos de clonagem estão apresentados com suas sequências de reconhecimento no enquadramento de leitura do terminal amino da β -galactosidase começando com o codon ATG à esquerda e terminando com o sítio *HaeIII* e o codon 8, com o codon para alanina à direita. os codons adicionais da sequência *lac* modificada nos sítios múltiplos de clonagem são contados separadamente (VIEIRA & MESSING, 1982).

Figura 3.3 Plamídio pFB39 (BUXTON et al., 1985, *apud* QUEIROZ, 1993) que é formado pelo vetor pUC8 e gene *argB* de *Aspergillus nidulans* (QUEIROZ, 1993).

Meio de cultura para bactérias semisólido (LBA)

LB	1 l
Ágar	15 g

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar protegido de luz.

Meio de cultura para bactérias LB e LBA com ampicilina

LB ou LBA	100 ml
Solução de ampicilina	400 ul

Preparar no momento do uso.

Meio mínimo para *Aspergillus* (PONTECORVO e col., 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Ajustar o pH para 6,8 com NaOH. Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar protegido de luz.

Meio mínimo para *Aspergillus* de acetato de amônio (API-

RION, 1962)

Acetato de amônio	12,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	traços
ZnSO ₄	traços
Ágar Difco	15 g
H ₂ O destilada	1000 ml

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar protegido de luz.

Meio mínimo para *Aspergillus* de galactose

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Galactose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

Ajustar o pH para 6,8 com NaOH. Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar protegido de luz.

Meio mínimo para *Aspergillus* suplementado com ácido nicotínico

Meio mínimo	20 ml
Solução de ácido nicotínico	0,1 ml

Meio mínimo para *Aspergillus* suplementado com adenina

Meio mínimo	20 ml
Solução de adenina	0,1 ml

Meio mínimo para *Aspergillus* suplementado com arginina

Meio mínimo	200 ml
Arginina	10 mM

Meio mínimo para *Aspergillus* suplementado com piridoxina

Meio mínimo	20 ml
Solução de piridoxina	0,1 ml

Meio mínimo para *Aspergillus* suplementado com riboflavina

Meio mínimo	20 ml
Solução de riboflavina	0,1 ml

Meio mínimo para *Aspergillus* suplementado com tiosulfato de sódio

Meio mínimo	20 ml
Solução de tiosulfato de sódio	0,1 ml

Meio mínimo para *Aspergillus* suplementado com uracila

Meio mínimo	20 ml
Solução de uracila	0,1 ml

3.5 Soluções**Solução de ácido nicotínico**

Ácido nicotínico	10 mg
H ₂ O destilada	100 ml

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de ácidos nucléicos de leveduras hidrolisados**Hidrolisado ácido.**

Ácido nucleico de levedura	2 g
HCl 1 N	15 ml

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20 minutos.

Hidrolisado alcalino.

Ácido nucleico de levedura	2 g
NaOH 1 N	15 ml

Misturar os dois hidrolisados, ajustar o pH para 6,0 com NaOH e filtrar. Ajustar o volume para 40 ml com H₂O destilada. Estocar em frasco escuro, a 4°C, com clorofórmio.

Solução de adenina

Adenina	500 mg
---------	--------

H ₂ O destilada	100 ml
----------------------------	--------

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de ampicilina (estoque)

Ampicilina	100 mg
------------	--------

H ₂ O destilada	10 ml
----------------------------	-------

Esterilizar passando a solução por filtro com poros de 0,20 µm.

Solução de brometo de etídio, concentrada

Brometo de etídio	10 mg
-------------------	-------

H ₂ O destilada	10 ml
----------------------------	-------

Preparar a solução usando luvas e máscara. Estocar em frasco escuro.

Solução de brometo de etídio, diluída

Solução de brometo de etídio	10 µl
------------------------------	-------

H ₂ O destilada	100 ml
----------------------------	--------

Manipular a solução usando luvas.

Solução de Denhardt 50X

Ficoll 400	1 % p/v
------------	---------

Polivinilpirrolidona	1 % p/v
----------------------	---------

BSA fração V	1 % p/v
--------------	---------

H ₂ O destilada	50 ml
----------------------------	-------

Aliquotar e estocar a -20°C.

Solução de EDTA (0,5 M, pH 8,0)

EDTA	0,5 M
NaOH	2 g
H ₂ O destilada	q.s.v. 100 ml

Acertar o pH com solução de NaOH concentrada. Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de EDTA (50 mM, pH 8,0)

Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0	10 ml
H ₂ O destilada	90 ml

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de glicerol

Glicerol	50 % v/v
H ₂ O destilada	50 % v/v

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos.

Solução de HCl 1 N

HCl p.e. 1,18	86,2 ml
H ₂ O destilada	913,8 ml

Preparar a solução em capela. Despejar sempre o ácido sobre a água e não o contrário.

Solução de KCl (0,6M pH 5,8)

KCl	0,6 M
Solução A	500 ml
Solução B	40 ml
Tampão fosfato	q.s.v. 1 l

Dissolver o KCl na solução A. Acertar o pH com a solução B. Completar o volume com o tampão. Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de NaOH concentrada

NaOH	40 g
H ₂ O	100 ml

Parte das pastilhas de NaOH não se dissolvem.

Solução de piridoxina

Piridoxina	5 mg
H ₂ O destilada	100 ml

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de riboflavina

Riboflavina	10 mg
-------------	-------

H₂O destilada 100 ml

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de tiosulfato de sódio

Tiosulfato de sódio 2 g

H₂O destilada 100 ml

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de Tris.HCl (1 M, pH 8,0)

Tris Base g

HCl ml

H₂O destilada q.s.v 100 ml

Acertar o pH com HCl.

Solução de Tween

Tween 80 0,01 ml

H₂O destilada 10 ml

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução de uracila

Uracila mg

H₂O destilada 100 ml

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20

minutos. Estocar a 4°C.

Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100,0 mg
Ácido γ-aminobenzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Água destilada esterilizada	100,0 ml

Esterilizar em banho-maria a 100°C por 20 minutos, sob clorofórmio. Estocar em frasco escuro a 4°C.

Solução NDS

EDTA (pH 8,0)	0,5 M
Tris-HCl (pH 9,5)	10 mM
N-Lauroylsarcosinato de sódio	1% p/v
Água destilada	q.s.v.

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução P1 (Qiagen)

RNase A	100 mg/ml
EDTA (pH 8,0)	10 mM
Tris/HCl	50 mM
Água destilada	q.s.v.

Solução P2 (Qiagen)

NaOH	200 mM
SDS	1 % p/v
Água destilada	q.s.v.

Solução P3 (Qiagen)

Acetato de Potássio (pH 4,8)	2,55 M
Água destilada	q.s.v.

Solução para depurinização

HCl	2 N
H ₂ O destilada	q.s.v.

Solução para desnaturação

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M
H ₂ O destilada	q.s.v.

Solução para hibridação

Tampão SSC 20X	30 %
Solução de Denhardt 50X	10 %
Pirofosfato de sódio	0,05 %
SDS	0,1 %
DNA de esperma de salmão	250 ug/ml
H ₂ O destilada	100 ml

Solução para lavagem 1

Solução SSC 20X	10 %
SDS	0,5 %
Pirofosfato de sódio	0,05 %
H ₂ O destilada	100 ml

Solução para lavagem 2

Solução SSC 20X	1 %
SDS	0,5 %
Pirofosfato de sódio	0,05 %
H ₂ O destilada	100 ml

Solução para marcação ("random primer")

Tampão de marcação 10X	5 ul
DNA polimerase 5 ul/ml	1 ul
dCTP	2 ul
dTTP	2 ul
dGTP	2 ul
dAT ³² P	5 ul

Solução para neutralização (transferência de DNA)

Tris (pH 7,4)	1 M
NaCl	1,5 M
H ₂ O destilada	q.s.v.

Solução para neutralização de sulfocrômica

Etanol	50% v/v
KOH (1M)	50% v/v

Solução para pré-hibridação

Solução	30 % v/v
Solução de Denhardt 50X	10 % v/v
SDS	0,5 % p/v
Pirofosfato de sódio	0,05 % p/v
DNA de esperma de salmão	100 µg/ml
H ₂ O destilada	100 ml

Solução salina

NaCl	89 mg
H ₂ O destilada	10 ml

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Solução SSC 20 X

Citrato de sódio	0,3 M
NaCl	3 M
H ₂ O destilada	q.s.v.

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos.

Solução SSC 2 X

Solução SSC 20X	10 ml
-----------------	-------

H ₂ O destilada	90 ml
----------------------------	-------

Solução sulfocrômica

Dicromato de potássio	20 g
H ₂ SO ₄ p.a.	200 ml
H ₂ O destilada	p/ 1 000 ml

Diluir o dicromato de potássio em aproximadamente 700 ml de água destilada com aquecimento. Resfriar a solução até a temperatura ambiente. Acrescentar o ácido sulfúrico.

Tampão de amostra de DNA

Azul de bromofenol	0,25 %
Glicerol	30 %
H ₂ O destilada	69,75 %

Tampão de eluição (Qiagen)

NaCl	1,25 M
MOPS (pH 8,2)	50 mM
Etanol	15 %

Tampão de equilíbrio (Qiagen)

NaCl	750 mM
MOPS (pH 7,0)	50 mM
Etanol	15 %
Triton X-100	0,15 %

Tampão de lavagem (Qiagen)

NaCl	1 M
MOPS (pH 7,0)	50 mM
Etanol	15 %

Tampão fosfato (0,2M pH 5,8)**Solução A**

NaH ₂ PO ₄	0,2 M
H ₂ O destilada	q.s.v.

Solução B

Na ₂ HPO ₄	0,2 M
H ₂ O destilada	q.s.v.

Tampão fosfato

Solução A	920 ml
Solução B	80 ml

Ajustar o pH adicionando solução B à solução A. Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Tampão TBE 5X

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA (0,5M pH 8,0)	20 ml
H ₂ O Milli Q	p/ 1 l

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

Tampão TE (pH 8,0)

Solução de Tris.HCl 1 M pH 8,0	0,01 ml
Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0	0,001 ml
H ₂ O destilada	9,989 ml

Autoclavar a 1 atmosfera, 120°C, por 20 minutos. Estocar a 4°C.

3.6. Obtenção de protoplastos de *Aspergillus nidulans*

Filtrar o micélio em filtro de Büchner, em bomba de vácuo, e lavar com vários volumes de solução de KCl.

Preparar o sistema de lise em tubo com tampa, de tamanho adequado: o micélio filtrado, solução de KCl na proporção de 20 ul/ mg do micélio úmido e enzimas liticas na proporção de 1% do peso do micélio úmido (50% Novozym 234 + 50% Celulase Onozuka) .

Incubar a 20°C, com agitação (120 rpm), por cerca de 1:30 h.

Coletar uma amostra e observar a protoplas-tização em lâmina, ao microscópio.

Centrifugar ligeiramente (30 segundos, a 2000 rpm). Filtrar o sobrenadante em seringa com lâ de vidro.

Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender completamente o precipitado em 10 ml de solução de KCl, com muita delicadeza, usando pipeta Pasteur.

Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender completamente o precipitado em 10 ml de solução de KCl, com muita delicadeza, usando pipeta Pasteur.

Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender completamente o precipitado em 10 ml de solução de KCl com muita delicadeza, usando pipeta Pasteur. Coletar uma amostra para contagem dos protoplastos.

Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender completamente o precipitado em volume adequado de solução de KCl.

3.7 Preparo de amostras de DNA para eletroforese em campo pulsado (Brody et al., 1991. Modificado)

Obter protoplastos.

Após a última lavagem com a solução de KCl, ressuspender em solução de KCl de modo a obter uma concentração de 3 a 4 x 10⁸ protoplastos por ml.

Manter a suspensão a 42°C, em banho-maria.

Preparar igual volume de solução de agarose LGT 1,4% em solução de KCl. Ferver para dissolver comple-

tamente a agarose. Deixar esfriar até 42°C. Manter em banho-maria.

Misturar iguais volumes das duas soluções. Com pipeta Pasteur homogeneizar a solução resultante, sempre em banho-maria.

Com pipeta Pasteur ou micropipetador automático com ponteira descartável para 1 ml cortada na ponta, colocar em molde próprio para preparo dos plugs e deixar gelificar na geladeira por 10 minutos.

Abrir o molde e retirar os bloquinhos de gel. Imergi-los cuidadosamente em vários volumes de tampão NDS, com 1% de proteinase K (enzima proteolítica obtida de *Tritirachium album*). Manter a 50°C por 18 horas.

Descartar o tampão NDS. Adicionar vários volumes de solução de EDTA (50 mM, pH 8,00) e manter a 50°C por 30 minutos.

Substituir a solução de EDTA e manter a temperatura ambiente por 30 minutos.

Substituir a solução de EDTA e manter a temperatura ambiente por 30 minutos.

Descartar a solução de EDTA e estocar os bloquinhos a 4°C em solução de EDTA (50 mM, pH 8,0).

3.8 Cruzamento de linhagens de *Aspergillus nidulans* (via sexuada)

Inocular placas de Petri contendo meio para

Aspergillus (com os nutrientes necessários a cada linhagem), colocando um ou dois cristais de sílica do estoque das linhagens.

Após 5 dias de crescimento, coletar com alça de platina quantidades iguais de micélio de cada linhagem e inocular um tubo de ensaio contendo meio mínimo mais 2% de meio completo.

Incubar a 37°C por 3 dias.

Retirar com alça de platina a película que se forma na superfície do meio de cultura e transferir para placa de Petri contendo meio mínimo.

Vedar a placa com fita adesiva de forma a impedir a entrada de ar.

Incubar a 37°C por 7 dias.

Abrir a placa sob estereoscópio e coletar com fio de platina um cleistotécio. Rolar o cleistotécio em ágar-água para eliminar restos de micélio aderidos na superfície.

Com o fio de platina colocar o cleistotécio em tubo de ensaio contendo solução de Tween e delicadamente comprimi-lo contra a parede do tubo de forma a liberar os esporos na solução.

Agitar bem e inocular 2 ul em placa de Petri com meio completo. Espalhar a solução de esporos com auxílio de alça de Drigalski.

Incubar a 37°C por 2 dias. Com fio de pla-

tina coletar material de 26 diferentes colônias e inocular, com auxílio de gabarito, em placa de Petri contendo meio completo, produzindo assim uma placa mestra.

Incubar a 37°C por 2 a 3 dias. Com auxílio de replicador de placa mestra inocular placas de Petri com meio seletivo.

Incubar a 37°C por 2 a 3 dias. Analisar as placas observando o desenvolvimento de cada colônia nos diversos meios de cultura testados.

Coletar material das colônias de interesse e inocular placas de Petri com meio seletivo adequado.

3.9 Extração de plasmídios de *E. coli* (Kit Qiagen)

Com alça de platina coletar bactérias do estoque em glicerol e inocular por estrias uma placa de Petri com meio de cultura para bactérias LBA mais ampicilina.

Incubar a 37°C por doze horas.

Com alça de platina, coletar uma colônia isolada e inocular um tubo de ensaio contendo 5 ml de LB mais ampicilina.

Incubar a 37°C sob agitação, 120 rpm, por doze horas.

Dividir a cultura obtida para inocular 2 frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de LB mais ampicilina.

Incubar a 37°C sob agitação, 120 rpm, por doze horas.

Centrifugar a 4°C, 6000 g, por 10 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado de bactérias em 4 ml de tampão P1. Os tubos da centrífuga devem ser mantidos em recipiente com gelo.

Adicionar 4 ml do tampão P2, misturar delicadamente e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

Adicionar 4 ml do tampão P3 e misturar imediatamente mas delicadamente. Remover o sobrenadante prontamente.

Centrifugar sobrenadante novamente a 4°C, 15000 g, por 10 minutos, para obter um lisado claro, livre de partículas.

Equilibrar uma coluna Qiagen (tip-100) com 3 ml do tampão de equilíbrio. Deixar drenar por gravidade.

Aplicar na coluna o sobrenadante da última centrifugação. Deixar drenar por gravidade.

Lavar a coluna com 10 ml do tampão de lavagem. Deixar drenar por gravidade.

Eluir o DNA plasmidial com 5 ml do tampão de eluição. Deixar drenar por gravidade e coletar o eluido em tubo esterilizado.

Precipitar o DNA com 2 volumes de isopropanol previamente equilibrado a temperatura ambiente.

Centrifugar a temperatura ambiente ou 4°C,

15000 g, por 30 minutos.

Lavar o DNA com etanol 70%. Secar ao ar por 15 minutos e redissolver em um volume adequado de tampão TE.

3.10 Transformação de bactérias com plasmídios

Com alça de platina coletar bactérias do estoque e inocular por estrias uma placa de Petri contendo meio de cultura para bactérias LBA.

Incubar a 37°C por doze horas.

Com alça de platina, coletar uma colônia isolada e inocular um tubo de ensaio contendo 5 ml de LB.

Incubar a 37°C sob agitação, 120 rpm, por doze horas.

Dividir a cultura obtida para inocular 2 frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de LB.

Acompanhar o desenvolvimento da cultura até atingir uma densidade de 4×10^7 células por ml. O acompanhamento é feito tirando-se amostras da cultura e medindo a densidade ótica em espectrofotômetro. A densidade adequada é $OD_{500} = 0,4$.

Deixar as culturas no gelo por 10 a 20 minutos.

Centrifugar a 4°C, 3000 rpm, por 10 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender as

células delicadamente em 25 ml de solução de CaCl_2 resfriada.

Centrifugar a 4°C , 3000 rpm, por 10 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender as células delicadamente em 25 ml de solução de CaCl_2 resfriada.

Centrifugar a 4°C , 3000 rpm, por 10 minutos.

Descartar o sobrenadante e ressuspender as células delicadamente em 2,5 ml de solução de CaCl_2 resfriada.

Manter os tubos no gelo por uma hora.

Pipetar 100 μl da solução com as bactérias e colocar num tubo de microcentrífuga. Adicionar 50 ng de plasmídios.

Manter os tubos no gelo por uma hora.

Guardar o restante da solução com as células a -20°C .

Colocar os tubos em banho-maria a 42°C por três minutos.

Adicionar 1 ml de meio de cultura para bactérias LB pré-aquecido e incubar a 37°C por uma hora.

Inocular 2 placas de Petri contendo LBA mais ampicilina, com 25 μl e 100 μl da suspensão de bactérias.

Incubar a 37°C por 12 horas.

Para efeito de controle, repetir os últimos 6 passos, excetuando a adição de plasmídios. Nestas placas não deve haver desenvolvimento de colônias das bactérias não transformadas.

3.11 Transferência de DNA de gel de agarose para membrana de náilon

Após eletroforese, transferir o gel para um recipiente de vidro e cortar as áreas não utilizadas com uma lâmina. Cortar o canto inferior esquerdo para servir de referência de posição nas etapas seguintes.

Se os fragmentos de DNA de interesse forem maiores que 15 kb, fazer uma depurinização, tratando o gel com vários volumes de solução para depurinização por 10 minutos sob leve agitação.

Descartar a solução para depurinização e enxaguar brevemente em água deionizada.

Descartar a água e imergir o gel em vários volumes de solução para desnaturação. Manter sob leve agitação por 45 minutos.

Descartar a solução para desnaturação e enxaguar brevemente com água deionizada.

Descartar a água e imergir o gel em vários volumes de solução para neutralização. Manter sob leve agitação por 30 minutos.

Substituir a solução para neutralização usada por vários volumes de solução nova. Manter sob leve agitação por mais 15 minutos.

Enquanto o gel estiver na solução para neutralização, preparar a membrana de náilon da seguinte maneira:

Usando uma lâmina nova, cortar um pedaço da membrana cerca de 1 mm maior que o gel em todos os lados. Cortar um dos cantos na mesma posição do corte de referência feito no gel. Usar luvas para manusear a membrana.

Colocar a membrana cortada flutuando numa superfície de água deionizada até umedecer completamente com a água passando pela membrana de baixo para cima.

Imergir a membrana em solução SSC 20X por pelo menos 5 minutos.

Remover o gel da solução para neutralização. Virá-lo de forma que a face superior fique voltada para baixo. Colocar o gel invertido sobre o suporte de modo que fique centrado nos papéis de filtro. Assegurar-se de que não fiquem bolhas de ar entre o papel e o gel.

Cobrir a superfície do suporte não ocupada pelo gel com filme de PVC ou outro material impermeável de modo a vedar a passagem do tampão de transferência diretamente da cuba para o papel toalha.

Colocar a membrana em cima do gel de forma que os cantos cortados fiquem alinhados. Não mover a mem-

brana depois de colocada sobre o gel. Assegurar-se de que não fiquem bolhas entre a membrana e o gel.

Umedecer duas folhas de papel de filtro cortadas exatamente do tamanho do gel em solução SSC 20X e colocá-los sobre a membrana. Assegurar-se de que não fiquem bolhas entre a membrana e o papel de filtro.

Cortar papel toalha em folhas ligeiramente menores que o gel. Empilhar o papel toalha (5 a 8 cm de altura) sobre o papel de filtro.

Colocar uma placa de vidro sobre o conjunto e sobre o vidro um peso de cerca de 500 g.

Deixar a transferência processar-se por cerca de 24 horas. Cuidar para que haja sempre papel toalha seco. Caso seja necessário, substituir o papel umedecido.

Remover o papel toalha e o papel de filtro de cima da membrana. Virar o gel e a membrana e colocar sobre uma folha de papel de filtro seca, o gel por cima.

Marcas na membrana, através do gel, com um lápis ou caneta esferográfica a posição das canaletas.

Imergir a membrana em solução SSC 2X por 5 minutos para remover fragmentos de gel que tenham ficado aderidos à membrana.

Corar o gel com solução de brometo de etídeo (diluída) para controlar a eficiência da transferência.

Remover a membrana do tampão e deixar o excesso de líquido escorrer. Deixar secar sobre papel de filtro por pelo menos 30 minutos a temperatura ambiente.

Fixar o DNA na membrana expondo-a a uma fonte de luz ultravioleta pelo tempo adequado.

Guardar a membrana envolvida em película de PVC ou papel alumínio, protegida de luz.

3.12 Separação de cromossomos de *Aspergillus nidulans* por eletroforese em gel de agarose em campo pulsado (BRODY & CARBON, 1989).

Preparar 2 l de tampão de corrida, diluindo tampão TBE 5X do estoque em água Milli Q (10% de tampão). Colocar em geladeira para resfriar.

Ferver 0,8 g de agarose em 100 ml do mesmo tampão TBE 0,5 X preparado para a corrida. Assegurar-se de que todos os cristais de agarose sejam dissolvidos.

Após resfriamento parcial, a temperatura ambiente, despejar a solução de agarose ainda líquida, em molde com pente próprio. Manter cerca de 1 ml da solução na fase líquida, em estufa a 50°C.

Aguardar a gelificação a temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos. Retirar o pente.

Despejar os bloquinhos com as amostras em placa de Petri esterilizada. Com espátula esterilizada cortar fatias dos bloquinhos e colocá-las nas canaletas

do gel.

Com pipeta, vedar as canaletas com agarose.

Despejar o tampão de corrida resfriado na cuba de eletroforese. Ligar o sistema de circulação e refrigeração. Ajustar a temperatura para 11°C.

Colocar o gel no lugar apropriado na cuba. Fechar a tampa e fazer a programação da corrida, com os seguintes parâmetros: 48 volts, 3000 segundos de pulso, 73 horas; 2700 segundos, 18 horas e 2200 segundos 73 horas.

Terminada a corrida, retirar o gel da cuba e corá-lo em solução de brometo de etídeo (diluída) por 30 minutos.

Lavar em água deionizada por 30 minutos. Fotografar em transiluminador com luz ultravioleta.

3.13 Estoque de *Aspergillus nidulans* em sílica

Inocular placa de Petri contendo o meio para *Aspergillus* adequado para a linhagem.

Incubar a 38°C por 5 a 7 dias.

Esterilizar tubos com tampa semi-rosqueada com cerca de 2 cm³ de sílica branca, a 150°C, por 5 horas. Deixar esfriar.

Preparar solução 5 a 10% de leite em pó desnatado (Molico) em água destilada. Esterilizar em banho maria por 20 minutos. Deixar esfriar.

Raspar com espátula todo material material

crescido na placa e dissolver em 3 ml da solução de leite em pó.

Despejar cerca de 500 μ l da solução em cada tubo com sílica. Agitar bem. Neste passo os tubos devem ser mantidos no gelo.

Estocar a 4°C.

3.14 Estoque de bactérias em glicerol

Com alça de platina coletar bactérias do estoque e inocular por estrias uma placa de Petri contendo meio de cultura para bactérias LBA (complementado com os nutrientes adequados, se necessário)

Incubar a 37°C por doze horas.

Com alça de platina, coletar uma colônia isolada e inocular um tubo de ensaio contendo 5 ml de LB (complementado, se necessário).

Incubar a 37°C sob agitação, 120 rpm, por doze horas.

Pipetar alíquotas de 1 ml da cultura para tubos de microcentrífuga. Acrescentar 0,5 ml de solução de glicerol.

Conservar a -20°C ou -70°C.

3.15 Hibridação de sondas de plasmídios com DNA fixado em membrana de náilon

Mergulhar a membrana em solução para pré-

hibridação. Incubar a 60°C por 5 horas ou mais.

Transferir a membrana para um saco plástico contendo solução para hibridação (0,2 ml de solução/cm² de membrana). Adicionar a sonda purificada.

Incubar a 60°C sob agitação por 12 a 15 horas.

Retirar a membrana do saco plástico e mergulhar em vários volumes da solução para lavagem 1 por 10 minutos a temperatura ambiente, sob leve agitação.

Substituir a solução usada por nova e manter por 10 minutos a temperatura ambiente, sob leve agitação.

Substituir a solução usada por nova e manter por 10 minutos a 60°C, sob leve agitação.

Repetir o passo anterior.

Substituir a solução usada por vários volumes da solução para lavagem 2 e manter por 20 minutos a 60°C, sob leve agitação.

Repetir o passo anterior.

Retirar a membrana da solução, escorrer o excesso e envolver a membrana em filme de PVC.

Em câmara escura, colocar em uma cassete para autoradiografia, com telas intensificadoras, um filme cortado na mesma posição do corte de referência da membrana. Sobre o filme colocar a membrana. Fechar a cassete e deixar a exposição do filme a -80°C pelo tempo adequado

(dois a dez dias).

Em câmara escura retirar o filme da casete. Imergir em solução para revelação (recomendada para o tipo de filme usado) por 3 minutos.

Retirar o filme da solução para revelação e imergir em água por 1 minuto.

Retirar o filme da água e imergir em solução fixadora (recomendada para o tipo de filme usado) por 5 minutos.

Retirar o filme da solução fixadora e imergir em água por um minuto.

Retirar o filme da água e deixar secar.

3.16 Marcação de sonda de DNA ("random priming")

Pipetar cerca de 35 μ l de uma solução 30 mg/ml dos plasmídios que serão marcados, já dessalinizados, para um tubo de microcentrífuga.

Ferver os plasmídios em banho-maria por cinco minutos.

Retirar o tubo da água e imediatamente colocar no gelo. Deixar resfriar por cinco minutos.

Pipetar 33 μ l da solução de plasmídios para um tubo contendo 17 μ l de solução de marcação. Incubar a 37°C por uma hora.

Adicionar 5 μ l de solução de EDTA (0,2 M pH 8,0) para estancar a reação.

Adicionar 50 ul de água bidestilada e ferver em banho-maria por 5 minutos.

3.17 Purificação de sonda de DNA marcada, por cromatografia de gel filtrante (Coluna de SEFADEX)

Despejar um volume adequado de esferas de agarose secas (SEFADEX) em frasco com excesso de volume de tampão TE.

Colocar uma pequena camada de lã de vidro siliconizada no fundo de uma seringa descartável de volume adequado.

Agitar o frasco de SEFADEX já expandido e logo em seguida pipetar, com pipeta Pasteur, o SEFADEX para a seringa até que esteja cheia. Assegurar-se de que não ficaram bolhas.

Colocar a seringa em tubo de centrífuga e centrifugar a 1500 rpm por 3 minutos.

Colocar sob a seringa, dentro do tubo de centrífuga, um tubo de microcentrífuga sem tampa. Despejar na coluna 100 ul de tampão TE. Centrifugar a 1500 rpm por 3 minutos.

Medir o volume de TE recuperado no tubo de microcentrífuga.

Repetir os dois passos anteriores até que o volume de TE recuperado seja 100 ul.

Substituir o tubo de microcentrífuga por um

novo. Despejar na coluna já equilibrada a solução de DNA marcado.

Centrifugar a 1500 rpm por 3 minutos.

Recuperar a sonda purificada.

3.18 Dessalinização de DNA

Em placa de Petri esterilizada colocar 2 ml de tampão TE e 18 ml de H₂O destilada.

Com uma pinça colocar uma rodela de membrana flutuando com a face brilhante voltada para cima. Usar membrana própria para diálise de gota, com poros de 0,02 nm.

Pipetar a solução de DNA para a superfície da membrana.

Deixar a dessalinização processar-se por cerca de 1 hora.

Pipetar a solução de DNA para um tubo de microcentrífuga.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em maio de 1993, no laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ, fez-se uma tentativa, pela primeira vez descrita na literatura, de transformar conídios de *Aspergillus nidulans* por meio de biobalística (FUNGARO et.al., 1995. Anexo 1).

A análise genética dos possíveis transformantes obtidos no processo foi feita com técnicas de genética clássica e molecular, inclusive de eletroforese em campo pulsado, objeto desta dissertação. Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da análise, feita inicialmente para um dos transformantes estáveis (a linhagem 16t).

A linhagem de *Aspergillus nidulans* submetida ao processo de transformação por biobalística foi obtida por meio de cruzamento sexual (conforme item 3.8) entre a linhagem MSE e uma linhagem *argB1;pyrG* (descritas no item 3.1). Este cruzamento foi feito para se obter uma linhagem portadora da marca *argB1* (que seria usada como marca seletiva no processo de transformação) e de uma segunda marca diferente de *pyrG*, visto que linhagens *pyrG* apresentam crescimento residual em meio seletivo, o que dificulta a distinção entre colônias *pyr+* e *pyr-*. Foi escolhida, entre as linhagens resultantes do cruzamento, a linhagem 16 (*yA2;argB1;nicB8*) que apresenta, em relação aos marcadores genéticos parentais, as seguintes carac-

terísticas fenotípicas: conídios amarelos, só se desenvolve em meios de cultura suplementados com arginina e ácido nicotínico, não necessita de uracila, adenina, piridoxina, riboflavina ou tiosulfato para se desenvolver e se desenvolve em meio contendo galactose ou acetato como única fonte de carbono. Não foram feitas análises complementares para determinar se o fenótipo *ade+* se deve à presença dos alelos mutantes nos locos *suA1ade20* e *ade20* ou à presença do alelo selvagem no loco *ade20*.

O vetor usado na transformação foi o plasmídeo pFB39 (descrito no item 3.3). Este vetor é um plasmídeo pUC8, em que se inseriu o gene selvagem *argB1* de *Aspergillus nidulans*.

Conídios da linhagem 16 foram submetidos a bombardeamento por micropartículas de tungstênio recobertas por plasmídios (metodologia e resultados no Anexo 1). Como consequência do bombardeamento, $1/10^6$ dos conídios germinaram e desenvolveram colônias em meio seletivo (sem arginina). Em placas de controle, com conídios não submetidos a bombardeamento, a frequência de germinação foi nula.

Para analisar uma das linhagens, chamada 16t, foram usados métodos da genética clássica e molecular. Os resultados foram analisados em função dos possíveis comportamentos do vetor (FINCHAM, 1989): considerando que o pFB39 não é auto-replicativo, a expectativa é de que

se integre ao genoma do fungo. Como a linhagem 16 contém o gene *argB1* (ainda que não funcional) é possível haver integração homóloga, de um único plasmídio (adição, substituição ou conversão gênica) ou de múltiplas cópias em tandem (adição). É possível, também haver integração ectópica, de uma ou mais cópias do plasmídio, em um ou mais locos no genoma nuclear, ou mitocondrial. Finalmente, a possibilidade do fenótipo *arg⁺* da linhagem 16t ser resultado de reversão natural do gene mutante da linhagem 16 e não de transformação, é discutida à luz dos resultados obtidos, ainda que o controle negativo tenha indicado, *a priori*, a inexistência de reversão desta marca.

A análise genética clássica consistiu de cruzamento sexual da linhagem 16t com a linhagem *biA1; methG1*, que é *arg⁺*. Todos os produtos deste cruzamento apresentaram fenótipo *arg⁺*. A análise de ligação situou o gene *argB1* no grupo de ligação III da linhagem 16t, fortemente ligado ao loco normal deste gene em *Aspergillus nidulans* (metodologia e resultados no Anexo 1).

Estes resultados são esperados tanto na hipótese de ocorrência de transformação por integração homóloga de um ou mais plasmídios como na hipótese de ocorrência de reversão gênica. Se houvesse integração heteróloga, os dois alelos estariam presentes no genoma e não estariam completamente ligados: o resultado esperado neste caso, visto que há dominância completa do gene sel-

vagem sobre o mutante, seria segregação, com cerca de 25% de colônias arg- no caso de integração em sítio não ligado ao gene argB1, tanto em outro cromossomo como a grande distância genética no próprio cromossomo III. O surgimento de uma porcentagem de colônias arg- entre 25% e 0% seria esperado em caso de integração heteróloga em sítio parcialmente ligado ao loco argB1 em função da ocorrência de permuta genética envolvendo os dois genes. Se houvesse integração ao DNA mitocondrial, ou replicação autônoma do plasmídeo, as colônias não seriam estáveis através dos ciclos mitóticos e no cruzamento sexual.

A análise molecular do DNA das linhagens 16 e 16t consistiu da análise de Southern de: 1- DNA total íntegro, 2- DNA total clivado com a enzima de restrição BamHI (que cliva o plasmídeo pFB39 em um único sítio) e 3- DNA dos cromossomos separados por eletroforese em campo pulsado (CHEF). A sonda utilizada foi o plasmídeo pUC8 (descrito no item 3.3). Como não há homologia entre as sequências do pUC8 com *Aspergillus nidulans*, os sinais revelados em autoradiografia indicam a presença do DNA bacteriano, contido no vetor de transformação pFB39.

No caso do DNA total não clivado constatou-se sinal de hibridação da sonda com DNA de alto peso molecular da linhagem 16t e nenhum sinal para a linhagem 16 (metodologia e resultados no Anexo 1).

Estes resultados são coerentes com a hipó-

tese de ocorrência de transformação com integração homóloga e/ou heteróloga de um ou mais plasmídios ao genoma nuclear do fungo e não ao DNA mitocondrial. Não se espera sinal de hibridação na hipótese de ocorrência de reversão ou conversão gênica.

No caso do DNA total clivado com a enzima *Bam*HI, observou-se sinal de hibridação formando uma única banda, na altura dos fragmentos com 7,760 kb (metodologia e resultados no Anexo 1).

Estes resultados sugerem a ocorrência de transformação com integração homóloga e/ou heteróloga de um único plasmídio ao genoma do fungo. A enzima *Bam*HI cliva o plasmídio integrado no interior do gene *argB1*, originando dois fragmentos compostos por sequências plasmidiais e sequências de DNA do fungo existentes entre o local de integração e os sítios de restrição mais próximos, a montante e a jusante do local de integração. O fragmento que não contém DNA bacteriano do pFB39 e portanto não apresenta homologia com a sonda (pUC8), não será evidenciado na autoradiografia (Figura 4.1). No caso de integração de dois ou mais plasmídios em tandem, o padrão de bandas esperado seria: uma banda na altura de fragmentos com o tamanho do plasmídio (6 kb) e outra banda com tamanho não previsível, maior que 6 kb. Não se espera sinal de hibridação na hipótese de reversão gênica (Figura 4.1).

No caso do DNA dos cromossomos separados por eletroforese em campo pulsado, vemos os resultados nas Figuras 4.1a e 4.1b. A Figura 4.1a mostra os cromossomos das linhagens 16t (1) e 16 (2) separados por eletroforese em campo pulsado, em gel de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultra violeta (metodologia descrita nos itens 3.6, 3.7 e 3.12).

Os oito cromossomos de *Aspergillus nidulans* são separados por este método em seis bandas, sendo que os cromossomos III e VI migram juntos formando uma banda dupla do mesmo modo que os cromossomos II e V (BRODY & CARBON, 1989). O peso molecular e a posição dos cromossomos estão assinalados na figura.

Na figura 4.1b a autoradiografia revela o sinal de hibridação da sonda pUC8 com DNA dos cromossomos separados e transferidos para membrana de náilon (conforme metodologia descrita nos itens 3.11, 3.15 e 3.16). Não se observa sinal em nenhum dos cromossomos da linhagem 16 (2). Na linhagem 16t (1) há sinal apenas na banda que agrupa dos cromossomos III e VI e na canaleta, onde fica detida grande quantidade de DNA de todos os cromossomos.

Estes resultados indicam a ocorrência de transformação, com integração homóloga e/ou heteróloga de um ou mais plasmídios pFB39 ao cromossomo III e/ou VI do fungo. Não se espera sinal de hibridação na hipótese de reversão ou conversão gênica.

Figura 4.1 (a) Separação de DNA cromossômico intacto de *Aspergillus nidulans* por eletroforese em campo pulsado em gel de agarose. (b) Análise de hibridação com pUC8 marcado com ^{32}P . Nas canaletas (1), DNA da linhagem 16t e nas canaletas (2), DNA da linhagem 16. Os grupos de ligação de *Aspergillus nidulans* estão indicados à esquerda. O número à direita corresponde ao tamanho dos cromossomos III e VI, em megabases.

O tipo de evento coerente com todos os resultados é a integração homóloga aditiva de um único plasmídio. Nenhum dos métodos, individualmente, é suficientemente indicativo desta interpretação e todos contribuíram para o detalhamento da análise e para corroborar esta conclusão final.

6. CONCLUSÕES

O uso de eletroforese em campo pulsado, é mais uma ferramenta de grande utilidade nos laboratórios voltados para o estudo genético de *Aspergillus nidulans* e outros microrganismos.

A obtenção do cariótipo eletroforético de linhagens de interesse, através da separação física dos cromossomos em gel de agarose, fornece informações novas para o pesquisador e confirma informações obtidas por outros métodos de análise genética, enriquecendo suas conclusões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOWAY, J.L. *Journal of Experimental Medicine*, v.55, p.91, 1932.
- APIRION, D. A general system for the selection of auxotrophs from prototrophs and vice-versa in microorganisms. *Nature*, v.195, p.959-961, 1962.
- ARMALEO, D.; YE, F.M.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JONHSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*, v.17, p.97-113, 1990.
- AVERY, D.T.; McLEOD, C.M.; McCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, v.79, p.137-158, 1944.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.P. *Exercícios práticos de genética*, São Paulo: Editora Nacional, 1973.
- BAILEY, A.M.; MENA, G.L.; HERRERA-ESTRELA, L. Transformation of four pathogenic *Phytophthora* spp by microprojectile bombardment on intact mycelia. *Current Genetics*, v.23, p.42-46, 1993.
- BALLANCE, D.J.; BUXTON, F.P.; TURNER, G. Transformation of *Aspergillus nidulans* by orotidine-5-phosphate the carboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 112, p.284, 1983.
- BALLANCE, D.J. & TURNER, G. Development of a high frequency transforming vector for *Aspergillus nidu-*

- lans*. **Gene**, v.36, n.3, p.321-331, 1985.
- BANCROFT, I. & WOLK, C.P. Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE). **Nucleic Acids Research**, v.16, n.15, p.7405-7418, 1988.
- BARNES, D.A. & MACDONALD, D.W. Behavior of recombinant plasmid in *Aspergillus nidulans*: structure and stability. **Current Genetics**, v.10, p.767-776, 1986.
- BEGGS, J.C. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. **Nature**, v.275, p.104-109, 1978.
- BEJ & PERLIN, 1989.
- BIER, M. (Ed.) **Electrophoresis. Theory, methods, and applications**. New York, Academic Press Inc., 1959, 560 p.
- BIRREN, B.W.; LAI, E.; CLARK, S.M.; HOOD, L. & SIMON, M.I. Optimized conditions for pulsed field gel electrophoretic separations of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n.15, p.7563-7582, 1988.
- BOYNTON, J.E.; GILLHAM, N.W.; HARRIS, E.J.; HOSLER, J.P.; JOHNSON, A.M.; JONES, A.R.; RANDOLPH-ANDERSON, B.L.; ROBERTSON, D.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. **Science**, v.240, p.1534-1537, junho, 1988.
- BRODY, H. & CARBON, J. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, p.6260-6263, 1989.

- BULL, J.H.; WOOTON, J.C. Heavily methylated amplified DNA in transformants of *Neurospora crassa*. *Nature*, v. 310, p.701-704, 1984.
- BUSTAMANTE, C.; GURRIERI, S.; SMITH, S.B. Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis. *Trends in Biotechnology*, v.11, p.23-29, janeiro, 1993.
- BUXTON, F.P.; RADFORD, A. Cloning of the structural gene for orotidine 5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*, v.190, p.403-405, 1983.
- BUXTON, F.P.; GWYNNE, D.I.; DAVIES, R.W. Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*, v.37, p.207-214, 1985.
- BUXTON, F.P.; RADFORD, A. The transformation of mycelial sphaeroplasts of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of an autonomous replicator. *Molecular and General Genetics*, v.196, p.337-344, 1984.
- CANTOR, C.R.; GAAL, A.; SMITH, C.L. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 3. Effect of electrical field shape. *Biochemistry*, v.27, p.9216-9221, 1988.
- CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R. *Biophysical Chemistry*. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1980, 682p.
- CARLE, G.F. Field-inversion gel electrophoresis. In: BURMEISTER, M. & ULANOVSKY, L. ed. *Pulsed-field gel electrophoresis. Protocols, methods, and theories*. Totowa: Humana Press, 1992, p.3-18.

CARLE, G.F. & OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, v.12, n.14, p.5647-5664, 1984.

CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*, v.232, p.65-68, 1986.

CHU, G. *Methods*, v.1, p.129-142, 1990.

CHU, G. Bag model for DNA migration during pulsed-field electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, p.11071-11075, 1991.

CHU, G. & GUNDERSON, K. Separation of large DNA by a variable-angle contour-clamped homogeneous electric field apparatus. *Analytical Biochemistry*, v.194, p.439-446, 1991.

CHU, G.; VOLLRATH, D. & DAVIS, R.W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, v.234, p.1582-1585, 1986.

CHU, G.; VOLLRATH, C.; DAVIS, R.W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, v.234, p.1582-1585, 1986.

COSLOY, S.D. & OISHI, M. Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.70, n.1, p.84-87, janeiro, 1973.

COSTA, S.O.P. da (coordenador). *Genética molecular e de*

microrganismos. Os fundamentos da engenharia genética.

São Paulo: Editora Manole Ltda., 1987. 559 p.

DAWSON, M.H. & SIA, R.H.P. In transformation of pneumococcal types. I. A technique for inducing transformation of pneumococcal types in vitro. **Journal of Experimental Medicine**, v.54, p.681-699, 1931.

deGENNES, P.-G. Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles. **Journal of Chemical and Physics**, v.55, p.572-578, 1971.

de GRAAFF, L.; BROECK, H. van den; VISSER, J. Isolation and transformation of the pyruvate kinase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v.13, p.315-321, 1988.

DEUTSCH, J.M. Theoretical studies of DNA during gel electrophoresis. **Science**, v.240, p.922-924, 1988.

DEUTSCH, J.M. The dynamics of DNA gel electrophoresis. In: BURMEISTER, M. & ULANOVSKY, L. ed. **Pulsed-field gel electrophoresis. Protocols, methods, and theories**. Totowa: Humana Press, 1992. p.367-384.

DOGGETT, N.A.; SMITH, C.L.; CANTOR, C.R. The effect of DNA concentration on mobility in pulsed field gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.4, p.859-864, 1992.

FANGMAN, W.L. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.5, p.653-665, 1978.

FINCHAM, J.R.S. Transformation in fungi. **Microbiological**

Reviews, v.53, p.148-170, 1989.

FUNGARO, M.H.P.; RECH, E.; MUHLEN, G.S.; VAINSTEIN, M.H.; PASCON, R.C.; QUEIROZ, M.V. de; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. de. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. *FEMS Microbiology Letters*, v.125, p.293-298, 1995.

GEMS, D.; JOHNSTONE, I.L.; CLUTTERBUCK, A.J. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*, v.98, p.61-67, 1991.

GOLDMAN, G.J.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Current Genetics*, v.17, p.169-174, 1990.

GRIFFITH, F. The significances of pneumococcal types. *Journal of Hygiene*, v.27, n.2, p.113-159, 1928.

GRUNSTEIN, M. & HOGNESS, D.S. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.72, n.10, p.3961-3965, outubro, 1975.

HILBER, U.W.; BODMER, M.; SMITH, F.D.; KOLLER, W. Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeriana*. *Current Genetics*, v.25, p.124-127, 1994.

HINNEN, A.; HICKS, J.B.; FINK, G.R. Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.75, n.4, p.1929-

1933, 1978.

HOLZWARTH, G.; McKEE, B.; STEIGER, S.; CRATER, G. Transient orientation of linear DNA molecules during pulsed-field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, v.15, n.23, p.10031-10044, 1987.

JONSTON, S.A.; ANZIANO, P.W.; SHARK, K.; SANFORD, J.C.; BUTOW, R.A. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science*, v.240, p.1538-1541, junho, 1988.

KHAN, N.C. & SEN, S.P. Genetic transformation of yeasts. *Journal of Molecular Biology*, v.83, p.237-250, 1974.

KIRKPATRICK, F.H. Overview of agarose gel properties. In: LAI, E. & BIRREN, B.W. ed. *Electrophoresis of large DNA molecules. Theory and applications. Current Communications in Cell & Molecular Biology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990. p.9-22.

KISTLER, J.C. & BENNY, U. Autonomous replicating plasmids and chromosome rearrangement during transformation of *Nectria haematococca*. *Gene*, v.117, p.81-89, 1992.

KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, v.327, p.70-73, maio, 1987.

KLOTZ, L.C. & ZIMM, B.H. Retardation times of deoxyribonucleic acid solutions. II. Improvements in apparatus and theory. *Macromolecules*, v.5, p.471-481, 1972.

KOLBLE, K. & SIM, R.B. An angle-variable three-dimensio

- nal pulsed field gel electrophoresis system. **Analytical Biochemistry**, v.192, n.1, p.32-38, 1991.
- LAI, E.; BIRREN, B.W.; CLARK, S.M.; HOOD, L. Relaxation intervals alter the mobility of large DNA molecules in pulsed field gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.10376, 1988.
- LERMAN, L.S. & FRISCH, H.L. Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? **Biopolymers**, v.21, p.995-997, 1982.
- LEVENE, S.D. & ZIMM, B.H. Separation of open-circular DNA using pulsed-field electrophoresis. **Proceedings National Academy of Science of United States of America**, v.84, p.4054-4057, 1987.
- LIU, J; HSIEH, Y.-Z; WIESLER, D.; NOVOTNY. Design of 3-(4-carboxybenzoyl)-2 quinoline carboxaldehyde as a reagent for ultrasensitive determination of primary amines by capillary electrophoresis using laser fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v.63, p.408-412, 1991.
- LÖBRICH, M.; IKPEME, S. & KIEFER, J. Analysis of the inversion effect in pulsed field gel electrophoresis by a two-dimensional contour-clamped homogeneous electric field system. **Analytical Biochemistry**, v.208, p.65-73, 1993.
- LORITO, M.; HAYES, C.K.; PIETRO, A.D.L.; HARMAN, G.E. Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. **Current Genetics**, v.24, p.349-356, 1993.

- MANDEL, M. & HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, v.53, p.159-162, 1970.
- MATHEW, M.K.; SMITH, C.L.; CANTOR, C.R. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 1. DNA size standards and the effect of agarose and temperature. *Biochemistry*, v.27, p.9204-9210, 1988a.
- MATHEW, M.K.; SMITH, C.L.; CANTOR, C.R. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 2. Effect of pulse time and electric field strength and implications for models of the separation process. *Biochemistry*, v.27, p.9210-9216, 1988b.
- MAULE, J. & GREEN, D.K. Semiconductor-controlled contour-clamped homogeneous electric field apparatus. *Analytical Biochemistry*, v.191, n.2, p.390-395, 1990.
- MCGREGOR, D.A. & YEUNG, E.S. Interactive control of pulsed field gel electrophoresis via real time monitoring. *Analytical Chemistry*, v.64, n.1, p.1-6, 1992.
- MESELSON, S.M.; RADDING, C.M. A general model for genetic recombination. *Proceedings National Academy of Science of United States of America*, v.72, n.1, p.358-361, 1975.
- MESELSON, M.; YUAN, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, v.217, p.1110-1114, 1968.
- MILLER, J.F.; DOWER, W.J.; TOMPKINS, L.S. *Proceedings Na*

tional Academy of Science of United States of America, v.85, p.856-860, 1988.

MISHRA, N.C. & TATUM, E.L. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. **Proceedings National Academy of Science of United States of America**, v.70, p.3875-3879, 1973.

OLIVERA, B.M.; BAINE, P.; DAVIDSON, N. Electrophoresis of the nucleic acids. **Biopolymers**, v.2, p.245-257, 1964.

ORR-WEAVER, T.L. & SZOSTAK, J.W. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. **Proceedings National Academy of Science of United States of America**, v.80, p.4417-4421, 1983a.

ORR-WEAVER, T.L.; SZOSTAK, J.W. Multiple tandem plasmid integration in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.3, p.747-749, 1983b.

ORR-WEAVER, T.L. & SZOSTAK, J.W. Fungal recombination. **Microbiological Review**, v.49, p.33-58, 1985.

ORR-WEAVER, T.L.; SZOSTAK, J.W.; ROTHSTEIN, R.J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. **Proceedings National Academy of Science of United States of America**, v.78, p.6354-6358, 1981.

PAIETTA, J.V. & MARZLUF, G.A. Plasmid recovery from transformants and the isolation of chromosomal DNA segments improving plasmid replication in *Neurospora crassa*. **Current Genetics**, v.9, p.383-388.

PASCON, R.C. Isolamento e caracterização de setores dete-
riorados da linhagem Abnc de *Aspergillus nidulans*.

- Piracicaba, 1994. 142 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. **Técnicas eletroforéticas de separação de cromossomos de microrganismos.** Piracicaba: FEALQ, 1989. 31p. Manual Técnico.
- POLI, R.C. **Análise Genética e molecular de transformantes de *Aspergillus nidulans* obtidos por biobalística.** Londrina, 1995. 146p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.S.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.
- QUEIROZ, M.V. de. **Transformação e clonagem de genes em *Aspergillus nidulans*.** Piracicaba, 1993. 101 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RAMPINO, N.J. & CHRAMBACH, A. Apparatus for gel electrophoresis with continuous monitoring of individual DNA molecules by video epifluorescence microscopy. **Analytical Biochemistry**, v.194, p.278-283, 1991.
- RAZANAMPARANY, V. & BÉGHERET, J. Non-homologous integration of transforming vectors in fungus *Podospora anserina*: sequences of junctions at the integration sites. **Gene**, v.74, p.399-409.
- SAMAC, D.A.; LEONG, S.A. Characterization of the termini

of linear plasmids from *Nectria haematococca* and their use in construction of an autonomously replicating vector. **Current Genetics**, v.16, p.187-194, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v.5, p.27-37, 1987.

SANSEAU, P.; TIFFOCHE, C.; KAHLOUN, A.-E.; COLLIN, O.; ROLLAND, J.-P. & LE PENNEC, J.P. Increased resolution of large DNA fragments by a two dimensional pulse field gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v.189, p.142-148, 1990.

SCHWARTZ, D.C. & CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.

SCHWARTZ, D.C.; SAFFRAN, W.; WELSH, J.; HAAS, R.; GOLDBERG, M.; CANTOR, C.R. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. **Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology**, v.47, p.189-195, 1982.

SERWER, P. Electrophoresis of duplex deoxyribonucleic acid in multiple concentration agarose gels: fractionation of molecules with molecular weights between 2×10^6 and 110×10^6 . **Biochemistry**, v.19, p.3001-3004, 1980.

- SERWER, P. Improvements in procedures for electrophoresis in dilute agarose gels. *Analytical Biochemistry*, v.112, p.351-356, 1981.
- SERWER, P. & HAYES, S.J. Exclusion of spheres by agarose gels during agarose gel electrophoresis: dependence on sphere's radius and gel's concentration. *Analytical Biochemistry*, v.158, p.72-78, 1986.
- SIA, R.J.P. & DAWSON, M.H. *In vitro* transformation of pneumococcal types. II. The nature of the factor responsible for the transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, v.54, p.701-710, 1931.
- SMITH, C.L. & CANTOR, C.R. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods in Enzymology*, v.155, p.449-467, 1987.
- SMITH, H.O. & WILCOX, K.W. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology*, v.51, p.379-391, 1970.
- SMITH, S.B.; ALDRIDGE, P.K.; CALLIS, J.B. Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science*, v.243, p.203-206, Janeiro, 1989.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, v.98, p.503-517, 1975.
- SOUTHERN, E.M.; ANAND, R.; BROWN, W.R.A. & FLECHTER, D.S. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids*

Research, v.15, n.15, p.5925-5943, 1987.

STELLWAGEN, N.C. Orientation of the agarose matrix by pulsed electric fields. In: BURMEISTER, M. & ULANOVSKY, L. ed. Pulsed-field gel electrophoresis. Protocols, methods, and theories. Totowa: Humana Press, 1992. p.385-402.

STELLWAGEN, J. & STELLWAGEN, N.C. Transient electric birefringence of agarose gels. I. Unidirectional electric fields. Biopolymers, v.34, n.2, p.187-201, 1994.

STINCHCOMB, D.T.; STRUHL, K.; DAVIS, R.W. Isolation and characterization of yeast chromosomal replicator. Nature, v.286, p.29-43, 1979.

STRUHL, K.; CAMERON, J.R.; DAVIS, R.W. Functional genetic expression of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. Proceedings from the National Academy of Sciences from the United States of America, v.73, n.5, p.1471-1475, maio, 1976.

SUDOR, J. & NOVOTNY, V. Separation of large DNA fragments by capillary electrophoresis under pulsed-field conditions. Analytical Biochemistry, v.66, p.2446-2450, 1994.

SZOSTAK J.W.; ORR-WEAVER, T.L.; ROTHSTEIN, R.J.; SCOLNIK, E.M. The double-strand break repair model for recombination. Cell, v.33, p.25-35.

TILBURN, J.; SCAZZOCHIO, C.; TAYLOR, G.T.; ZABICKY-AISSMAN, J.H.; LOCKINGTON, R.A.; DAVIES, W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene, v.26, n.2-3, p.205-221, 1983.

- TIMBERLAKE, W.E. & MARSHALL, M. Genetic engineering of filamentous fungi. *Science*, v.244, p.1313-1317, 1989.
- TISELIUS, A. Introdução. In: BIER, M., ed. *Electrophoresis. Theory, methods and applications*. New York: Academic Press Inc., 1959. p.XV-XX.
- TSUKUDA, T.; CARLETON, S.; FOTHERINGHAM, S.; HOLLOMAN, W.K. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and Cellular Biology*, v.8, p.3703-3709, 1988.
- TURMEL, C.; BRASSARD, E.; SLATER, G.W.; NOOLANDI, J. Molecular detrapping and band narrowing with high frequency modulation of pulsed field electrophoresis. *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.569-575, 1990.
- VAINSTEIN, M.H.; ALVES, S.A.; LIMA, B.D.; ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. Stable DNA transfection in a flagellate trypanosomatid by microparticle bombardment. *Nucleic Acids Research*, v.22, n.15, p.3263-3264, 1994.
- VIOVY, J.L. & DÉFONTAINES, A.D. Reptation theory of pulsed electrophoresis and trapping electrophoresis. In: BURMEISTER, M. & ULANOVSKY, L., ed. *Pulsed-field gel electrophoresis. Protocols, methods, and theories*. Totowa: Humana Press, 1992. p.403-450.
- VOLLRATH, D. & DAVIS, R.W. Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields. *Nucleic Acids Research*, v.15, n.19, p.7865-7876, 1987.

- YANAGIDA, M.; HIRAOKA, Y. & KATSURA, I. Dynamic behaviors of DNA molecules in solution studied by fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology*, v.47, p.177-187, 1982.
- YELTON, M.; TIMBERLAKE, W.E.; HONDEL, A.M.J.J. van den. A cosmid for selecting genes by complementation in *Aspergillus nidulans*: selection of the developmentally regulated yA locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.82, p.834-838, 1985.
- YUIEL, E. Two new *Aspergillus* mutants. *Journal of Botany*, v.77, p.174-175, 1939.
- WERNARS, K.; GOOSEN, T.; SEWART, K.; BROEK, H.W.J. van den. Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* AmdS⁺ transformants. *Molecular and General Genetics*, v.205, p.312-317, 1986.
- WRIGHT, A.P.H., MAUNDRELL, K.; SHALL, S. Transformation of *Schizosaccharomyces pombe* by non-homologous, unstable integration of plasmids in the genome. *Current Genetics*, v.10, p.503-508, 1986.
- ZHANG, T.Y.; SMITH, C.L.; CANTOR, C.R. Secondary pulsed field gel electrophoresis: a new method for faster separation of larger DNA molecules. *Nucleic Acids Research*, v.19, n.6, p.1291-1296, 1991.
- ZIEGLER, A. & VOLZ, A. Rotating field gel electrophoresis (ROFE). In: BURMEISTER, M. & ULANOVSKY, L., ed. *Pulsed-field gel electrophoresis. Protocols, methods, and theories*. Totowa: Humana Press, 1992. p.63-72.

ANEXO

Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia

Maria Helena P. Fungaro ^{a,*}, Elibio Rech ^b, Gilda S. Muhlen ^a,
Marilene H. Vainstein ^c, Renata C. Pascon ^a, Marisa V. de Queiroz ^a,
Aline A. Pizzirani-Kleiner ^a, João Lúcio de Azevedo ^a

^a Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, P.O. Box 83, 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil

^b Cenargen / Embrapa, 70849-970, Brasília, DF, Brazil

^c Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

Received 12 October 1994; revised 23 November 1994; accepted 23 November 1994

Abstract

This paper describes transformation of intact conidia of *Aspergillus nidulans*, auxotrophic for arginine, by using the biolistic process. The plasmid employed was pFB39, carrying the *argB* gene. The transformation frequency obtained was 81 transformants/ μ g of DNA. Classical genetics and molecular analysis were conducted to analyse transformants and to determine in which chromosome integration took place.

Keywords: *Aspergillus nidulans*; Fungal transformation; Biolistic gene transfer; Conidial transformation

1. Introduction

Development of efficient technologies for introducing and expressing foreign genes in cells are imperative for basic studies of gene regulation and practical utilisation of transfected organisms. Over the last years, the biolistic technology has been extensively utilised to introduce and express desirable traits in microbial, plant and animal cells [1–5]. In filamentous fungi particle bombardment has been

used to transform *Neurospora crassa* [6], *Phytophthora* spp [7], *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* [8].

The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is particularly suited for the study of events involved in gene expression and regulation, due to the existence and extensive characterisation of both sexual and parasexual cycles [9,10]. Although protoplasts isolated from *A. nidulans* mycelium have been transformed by PEG-DNA uptake, their multinucleate condition can lead to the undesirable formation of heterokaryons. In this report, we demonstrate the utilisation of biolistics, as a simple and efficient process to achieve transformation of conidia of *A.*

* Corresponding author.

nidulans. The successful recovery of stable transformants was demonstrated by classical and molecular genetic approaches.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid and *Aspergillus* strains

Strain *yA2;argB1;nicB8* (yellow conidiospores, arginine and nicotinic acid requirements) was used as recipient in transformation experiments. Strain *biA1;methG1* (biotin and methionine requirements) was used in genetic crosses. The plasmid pFB 39, used for transformation, was kindly provided by Dr. C. Scazzocchio. It is a pUC8-based plasmid carrying the *argB* gene from *A. nidulans* encoding ornithine carbamoyl transferase. The plasmid pUC8 was used as probe.

2.2. Growth medium

The minimal medium (MM) used for *A. nidulans* was as described by Pontecorvo et al. [9]. MM contained per litre of deionized water: 10 g glucose, 6.0 g NaNO₃, 0.5 g KCl, 0.5 g MgSO₄, 7H₂O, 1.5 g KH₂PO₄ and 1 mg each of FeSO₄, ZnCl₂ and CuSO₄. Before autoclaving, the pH was adjusted to 6.8 with NaOH. If appropriate, MM was solidified with 1.5% Difco agar.

2.3. Preparation of cells and microprojectiles for bombardment, and biolistic transformation protocol

Approximately 5.5×10^7 conidia of the *yA2;argB1;nicB8* *A. nidulans* strain were placed on Petri dishes containing minimal medium [9] supplemented with 10 μ M nicotinic acid and 1.0 M sorbitol. The cells were slowly dried onto the surface of the medium before bombardment. The preparation of microparticles was conducted essentially as previously described [5]. Basically, tungsten microparticles (0.5 μ g average diameter, M5, Sylvania Inc.) were coated with the plasmid DNA pFB39 by mixing sequentially into an Eppendorf tube: 50 μ l microparticles (60 mg ml⁻¹ stock solution in 50% glycerol), 5 μ l of DNA (1.0 μ g μ l⁻¹), 50 μ l CaCl₂

(2.5 M), 20 μ l spermidine free-base (0.1 M). After a 10 min incubation, the DNA-coated microparticles were centrifuged at $15\,000 \times g$ and the supernatant was removed. The pellet was washed with 150 μ l of 70% ethanol and with 100% absolute ethanol, respectively. The final pellet was re-suspended in 24 μ l of absolute ethanol and sonicated for 2 s, and used immediately. Aliquots of 3 μ l of this sample were spread onto the carrier membrane (Kapton, 2 mil, DuPont) and allowed to evaporate in a dessicator, under 30% relative humidity for 10 min. Each carrier membrane contained 0.5 mg microparticles and 0.8 μ g plasmid DNA. The relative humidity in the biolistic lab was 50%, the gap distance from the shock wave generator and the carrier membrane was 1 cm, the carrier membrane flying distance to the stopping screen was 13 mm and the vacuum in the chamber was 27 inches of Hg in all experiments. The Petri dishes containing the conidia were positioned 80 mm below the DNA-coated microparticles launch position, and bombarded using pressures of 1300 psi. Immediately after the bombardment, the plates were incubated at 37°C for 2–3 days. The frequency of transformation was based on six replicates.

2.4. Sexual crosses

Sexual crosses between transformed and *biA1;methG1* strains were set up on minimal medium using standard techniques [9]. The progeny derived from selfed and hybrid cleistothecia was analysed for the proportions of the *argB*⁺ and *argB*⁻ phenotypes by plating in MM supplemented with 10 mM arginine, 10 μ M nicotinic acid, 0.4 mM methionine and 20 μ M biotin and also in the same medium free of arginine.

2.5. Isolation and manipulation of DNA

DNA was extracted from mycelia of transformed and non-transformed strains by the method of Raeder and Broda [11]. The strains were grown in shaken culture for 24 h at 37°C in MM containing nicotinic acid with or without arginine (10 mM).

Standard procedures for restriction endonuclease digestion, agarose gel electrophoresis and Southern blotting were carried out as described by Sambrook

et al. [12]. Approximately 3 μg of total genomic DNA was electrophoresed in each track. $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP probes of plasmid pUC8 were prepared by random priming (Biolabs random priming kit). Hybridization was performed according to the manufacturer's instruction. Nylon filters were exposed to a Kodak film at -70°C .

2.6. Electrophoretic karyotype

The electrophoretic karyotypes of transformed and non-transformed strains were analysed with contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis according to Brody and Carbon [13], slightly modified. 10^9 conidia were inoculated in 100 ml of MM containing nicotinic acid and supplemented or not with arginine. The culture was incubated at 37°C for 15 h with vigorous shaking. Mycelial cells were harvested by filtration and rinsed briefly with 0.6 M KCl. The mycelia (800 mg) were suspended in 20 ml of an enzymatic solution containing 5% Novozym 234 (Novo Industri, A/S) and 5% Cellulase R10 Onozuka prepared in 0.6 M KCl. The cells were made into protoplasts by incubation for 1–2 h at 30°C with gentle swirling. The suspension was centrifuged at $160 \times g$ for 30 s and then filtered through glass wool. The protoplasts were then pelleted at $250 g$ for 10 min and washed twice with 10 ml of 0.6 M KCl. The pellet was re-suspended in 0.6 M KCl such that the concentration of protoplasts was 4×10^8 per ml. The suspension was then incubated at 42°C . An equal volume of 1.4% agarose (Sigma A4018), prepared in 0.6 M KCl and precooled was added. The agarose-protoplast mixture was poured into a plug mold ($2 \times 10 \times 20$ mm) and solidified on ice for 10 min. The agarose plugs were immersed in NDS buffer (0.5 M EDTA, pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% sodium N-lauroylsarcosinate) containing proteinase K (1 mg ml^{-1}) at 50°C for 24 h. The plugs were then washed three times in 50 mM EDTA (pH 8.0). Quarters of the agarose plugs were inserted into the gel (0.8% agarose Sigma A2929, $0.5 \times \text{TBE}$) wells and sealed with agarose. Gel was electrophoresed at 11°C in $0.5 \times \text{TBE}$ at 48 V with three pulse intervals of 50, 45 and 37 min at 73, 18 and 73 h, respectively. The gel was stained in ethidium bromide. Southern blotting and hybridization procedures were performed as described previously.

3. Results and discussion

It was demonstrated that conidia of *A. nidulans* can be efficiently transformed using the biolistic process. Transformants were recovered at a frequency of $81 \pm 48 \mu\text{g}^{-1}$ DNA, or 10^{-6} expressed as the number of transformants over the total number of conidia on the bombarded plate. This value represents an original and preliminary result on transformation of *A. nidulans* conidia by the biolistic process. Several physical and biological variables such as the microprojectile's size, and osmotic composition of the medium and cell density, were described to modulate the efficiency of the process in plants and microorganisms [6,8] and could be assayed to improve the method used in this work. Six percent of transformants showed immediate vigorous growth while 94% showed reduced initial growth. Among the large colonies, one was selected for classical and molecular analysis. To demonstrate the association of the *argB*⁺ phenotype with transforming DNA, undigested and digested genomic DNA of transformed and non-transformed strains were analysed (Fig. 1). The DNA from the transformant hybridized to labelled pUC8, whereas the DNA of the recipient

Fig. 1. Southern transfers of undigested and *Bam*HI-digested DNA from transformed (lanes 1 and 4, respectively) and non-transformed (lanes 2 and 3, respectively) strains of *A. nidulans* probed with ^{32}P -labelled pUC8. Molecular masses are indicated on the right.

strain showed no hybridization with the vector. With undigested DNA hybridization occurred only with high molecular mass DNA, suggesting that transformation took place through integration of plasmid DNA into the genome. Total DNA of the transformed strain digested with *Bam*HI showed a single band hybridized to the plasmid probe.

This transformant was meiotically and mitotically stable. When conidia were subcultured on non-selective media, no loss of the *argB*⁺ phenotype was observed after four successive transfers. To study meiotic stability, two selfed cleistothecia were analysed and over 400 segregants were screened. All segregants were of the *argB*⁺ phenotype.

Plasmids can integrate into genome at both homologous and heterologous sites. Timberlake [14] defines homologous sites as those with known identity between plasmid and genomic DNA sequences. In some cases, transformation of a mutant strain leads to no detectable changes in the genome due to the replacement of mutant allele by the wild-type without plasmid integration. This situation presumably arises from simple gene conversion or double crossover events. It was not the case in the present study, as shown by Southern blotting (Fig. 1). Sim-

ple homologous recombination events involving plasmid DNA and the genome will lead to formation of directly repeated sequences separated by plasmid DNA sequences. The transformants with heterologous integration have no sequence modifications in the vicinity of the resident allele. The plasmid vector integrates elsewhere in the genome and the site of integration varies from one transformant to another. This is attributed to a single crossover between the plasmid and various non-homologous chromosome sites.

If the copy of the gene derived from the transformation event is stable through meiosis, homologous and heterologous integration can be distinguished by classical genetic methods. When an *argB*⁺ gene is integrated in a position unlinked to the normal site of the gene in chromosome III, one would predict that, in crosses to the wild-type, around 25% of the progeny should be *argB*⁻. On the other hand, if the *argB*⁺ gene integrates tightly linked with the resident *argB* locus, 100% *argB*⁺ progeny would be expected. A sexual cross involving the transformant and the *biA1; methG1* strain was carried out and 234 segregants were analysed. All the segregants were *argB*⁺ in phenotype, suggesting that the plasmid integration occurred at or very near to the resident *argB* locus in the chromosome III. The high meiotic stability of this transformant is unusual since transformants resulting from homologous integration are frequently unstable through the sexual cycle [14].

Pulsed-field gel electrophoresis technology has been used to resolve the genomes of several organisms into defined chromosomal bands. *A. nidulans* possesses a haploid complement of eight genetic linkage groups. Using contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis Brody and Carbon [13] resolved the genome of *A. nidulans* into six chromosomal bands, with two bands migrating as doublets. In order of decreasing size the chromosomes are: VIII (5.0 Mb), VII (4.5 Mb), II (4.2 Mb), I and V (3.8 Mb), III and VI (3.5 Mb), and IV (2.9 Mb). Intact chromosomal DNA from transformed and non-transformed strains is shown in Fig. 2a. Hybridization analysis using labelled pUC8 probes assigned the transforming sequences to the 3.5 Mb double band (Fig. 2b), containing linkage groups III and VI. This finding agrees with classical genetic analysis showing that plasmid integration is

Fig. 2. Separation of *A. nidulans* intact chromosomal DNA on a CHEF gel (a) and analysis of hybridization with ³²P-labelled pUC8 (b) of transformed (lane 1) and untransformed (lane 2) strains. The linkage groups of *A. nidulans* are indicated on the left. The number on the right corresponds to the size of chromosomes III and VI in megabases.

tightly linked with the resident *argB* locus in chromosome III.

Acknowledgements

M.H.P.F. is supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) as a Visitor Researcher at ESALQ/USP, on leave from Universidade Estadual de Londrina, Brazil.

References

- [1] Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D. and Allen, N. (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Technol.* 5, 27–37.
- [2] Christou, P., McCabe, D.E. and Swain, W.F. (1988) Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* 87, 671–674.
- [3] Klein, T.M., Arentzen, R., Lewis, P.A. and Fitzpatrick-McElligott, S. (1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10, 286–291.
- [4] Aragão, F.J.L., Grossi-de-Sá, M.F., Almeida, E.R., Gander, E.S. and Rech, E.L. (1992) Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* 20, 357–359.
- [5] Vainstein, M.H., Alves, S.A., Lima, B.D., Aragão, F.J.L. and Rech, E.L. (1994) Stable DNA transfection in a flagellate trypanosomatid by microparticle bombardment. *Nucleic Acids Res.* 22, 3263–3264.
- [6] Armaleo, D., Ye, G.N., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C. and Johnston, S.A. (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* 17, 97–103.
- [7] Bailey, A.M., Mena, G.L. and Herrera-Estrella, L. (1993) Transformation of four pathogenic *Phytophthora* spp by microprojectile bombardment on intact mycelia. *Curr. Genet.* 23, 42–46.
- [8] Lorito, M., Hayes, C.K., Pietro, A.D.L. and Harman, G.E. (1993) Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr. Genet.* 24, 349–356.
- [9] Pontecorvo, G., Roper, J.A., Memmons, L.M., McDonald, K.D. and Bugton, A.W.J. (1953) Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141–238.
- [10] Clutterbuck, A.J. (1974) *Aspergillus nidulans*. In: *Handbook of Genetics* (King, R.C., Ed.), vol. 1, pp. 447–510. Plenum Press, New York.
- [11] Raeder, U. and Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1, 17–20.
- [12] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [13] Brody, H. and Carbon, J. (1989) Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6260–6263.
- [14] Timberlake, W.E. (1991) Cloning and Analysis of Fungal Genes. In: *More Gene Manipulation in Fungi* (Bennett, J.W. and Lasure, L.L., Eds.), pp. 51–83. Academic Press, New York.