

Enhancer/Suppressor mutator (En/Spm)-like transposable elements of cassava (*Manihot esculenta*) are transcriptionally inactive

M.A. Gbadegesin and J.R. Beeching

Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, United Kingdom The present address of M.A. Gbadegesin is Department of Biochemistry, Molecular Biology Unit, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

Corresponding author: M.A. Gbadegesin E-mail: magbadegesin@yahoo.com

Genet. Mol. Res. 9 (2): 639-650 (2010) Received December 16, 2009 Accepted January 6, 2010 Published April 13, 2010 DOI 10.4238/vol9-2gmr713

ABSTRACT. Transposable elements contribute to the size, structure, variation, and diversity of the genome and have major effects on gene function. Sequencing projects have revealed the diversity of transposable elements in many organisms and have shown that they constitute a high percentage of the genome. PCR-based techniques using degenerate primers designed from conserved enzyme domains of transposable elements can provide quick and extensive surveys, making study of diversity and abundance and their applications possible in species where full genome sequence data are not yet available. We studied cassava (Manihot esculenta) En/Spm-like transposons (Meens) with regard to genomic distribution, sequence diversity and methylation status. Cassava transposase fragments characteristic of En/Spm-like transposons were isolated, cloned and characterized. Sequence analysis showed that cassava En/Spm-like elements are highly conserved, with overall identity in the range of 68-98%. Southern hybridization supports the presence of multiple copies of En/Spm-like transposons integrated in the genome of all cassava cultivars that we tested. Hybridization patterns of HpaII- and MspI-digested cassava genomic DNA revealed highly methylated sequences. There were no clear differences in hybridization

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

pattern between the cultivars. We did not detect RNA transcripts of *Meens* by Northern procedures. We examined the possibility of recent transposition activities of the cassava *En/Spm*-like elements.

Key words: Cassava; Transposable elements; Transposon; En/Spm

INTRODUCTION

Transposable elements (TEs) have been classified into two major superfamilies according to their transposition intermediate and transposition mechanisms (Finnegan, 1992). Class I elements (retrotransposons or retroelements) move and amplify through RNA intermediates, which are reverse transcribed before their integration into the nuclear genome. They are the most widespread class of eukaryotic TEs (SanMiguel et al., 1996; Lander et al., 2001). Class II elements (DNA TEs) move by excision and reintegration via a DNA intermediate; they transpose by a "cut and paste" mechanism mediated by a transposase that recognizes their short terminal inverted repeated (TIRs) sequences. *Enhancer/Suppressor mutator (En/Spm*) TEs belong to this class.

Peterson (1953) and McClintock (1954) independently discovered the *En/Spm* TE system. Peterson named the autonomous element *Enhancer* (*En*), while McClintock called it *Suppressor-mutator* (*Spm*). Autonomous TEs consist of sequences that are required *in cis* for transposition and express trans-acting proteins, whereas the non-autonomous elements do not express these proteins and can only transpose if the proteins are supplied by an autonomous element elsewhere in the genome. The non-autonomous element is called *Inhibitor/defective Suppressor-mutator* (*I/dSpm*). *En/Spm* is the most thoroughly studied member of the CACTA TE superfamily. The characteristic features of the CACTA elements are the presence of TIRs terminating with the sequence CACTA and the creation of 3-bp TSDs. Figure 1 summarizes the structural features of *En/Spm* of maize.

En/Spm transposons have proved to be useful in the isolation of many maize and *Antirrhinum* genes (Luo et al., 1991; Tissier et al., 1999). They have the advantage of exhib-



Figure 1. Structural organization of *Enhancer/Suppressor mutator* (*En/Spm*) of maize. *En/Spm* is an ~8.3-kb DNA transposon flanked at the termini by terminal inverted repeats (TIRs) shown as triangles. Exon sequences for the two genes of *En/Spm* are shown as shaded boxes: *TnpD* codes for the gene product TNPD or the transposase, while *TnpA* codes for TNPA. The open boxes represent the introns. TNPA protein binds to the sub-terminal sequence motifs (each 12 bp), which are scattered within ~180 bp at the 5' end (nine) and ~300 bp at the 3' end (fifteen) shown. At the 5' end, the most internal of the TNPA binding motifs overlaps with the TATA box, which exists as TATGAA in *En/Spm*.

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

iting frequent reversion of the disrupted gene to wild-type due to excision of the transposon. Suppression, a phenomenon characterized by the ability of an active transposon to change the degree of the phenotype produced by an insertion without excision, is another attribute of *En/Spm*, which may contribute to tagging effectiveness. This depends on the *TnpA* gene product of *En/Spm*, which acts by binding at the sub-termini of *En/Spm* or *I/dSpm* elements and interfering with transcription of the host gene (Grant et al., 1990, 1993).

En/Spm has successfully been exploited as a tool for functional genomics in *Arabidopsis* by using it to generate mutant lines (Wisman et al., 1998; Tissier et al., 1999; Speulman et al., 1999). The present study assessed the presence and activity of *En/Spm*-like transposons in cassava. *En/Spm*-like transposons could be used to elucidate the apparently subtle actions of genes and might have potential as a tool for genomic analysis and biotechnological development of cassava. To date, there has not been any published information as to the presence and nature of *En/Spm*-like transposons in cassava.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Young leaf samples for the isolation of DNA and total RNA were obtained from various cassava cultivars. Cassava plants were grown in the tropical glasshouse at the University of Bath at 22-28°C, with a relative humidity of 40-80% and a minimum light period of 12 h per day under daylight, supplemented with 400 W Phillips high-pressure sodium lights when necessary.

PCR amplification of transposase fragment of cassava En/Spm-like sequences and cloning

The polymerase chain reaction (PCR) method used was as described by Staginnus et al. (2001), with some modifications as follows: 50- or 100- μ L PCR mixes contained 50 pmol of each primer, 0.5 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, and 250 ng template DNA, using a PCR cycle of 94°C (2 min), 35 times [at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min], and at 72°C for 5 min. Amplified DNA bands were gel purified (Qiagen, Qiaquik), ligated into pGEM[®]-T Easy vector (Promega) and used to transform competent *Escherichia coli* DH5 α according to standard procedures (Sambrook et al., 1989).

DNA gel blot analysis

Cassava genomic DNA was isolated from young leaves by the method of Dellaporta et al. (1983). Restriction digestions of genomic DNA (5 μ g each) were carried out using buffer and reaction conditions specified by the manufacturer (Promega). Blotting and hybridization were performed using standard procedures (Sambrook et al., 1989).

DNA sequencing and sequence analyses

DNA molecules were sequenced on an ABI 337 automated dye primer sequencer using universal primers for the cloning vector. Initial confirmation of sequence identity was by BLASTN and TBLASTX searches against the GenBank non-redundant database

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

using the default parameters (Altschul et al., 1990). Sequence data were aligned using CLUSTAL W (version 1.82) (Thompson et al., 1994).

Wounding and incubation procedures

Wounding stress was induced in cassava leaves with a modified method of Takeda et al. (1998). In one set of experiments, leaf discs were prepared by cutting young cassava (cultivar MCOL22) leaves into discs of approximately 1 cm². In a second, the leaf segments prepared from young leaves were stabbed with the points of a forceps about twenty times. The leaf segments (stabbed or unstabbed) were then incubated on 0.05% 2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid (MES)-KOH buffer, pH 5.7, at 25°C under ambient light. MES is generally used in tissue culture to prevent oxidative degradation of biomolecules. Leaf samples were taken at 2, 4, 6, 8, 12, 24, and 48 h from the incubation mix, rapidly wrapped with aluminum foil and submerged in liquid nitrogen. These were immediately ground to a fine powder with a mortar and pestle and the powdered leaves stored at -70°C until required. Total RNA was isolated from the powdered samples of leaves as below. For the root, the conditions for deterioration experiments were as described by Han et al. (2001).

RNA extraction and Northern blot procedures

Using 2-mL nuclease-free microfuge tubes, RNA was extracted from the homogenized tissue using the Promega SV total RNA isolation system with some modifications to the specifications of the manufacturer as follows: $350 \ \mu$ L lysis buffer was added to 0.09 g of the ground tissue in the microfuge tube and mixed by inversion. RNA dilution buffer (700 μ L) was then added and the contents again mixed by inversion before centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. The cleared lysate solution was then transferred to a fresh microfuge tube by pipetting without disturbing the pelleted debris, and the centrifugation step was repeated. A volume of 400 μ L 95-100% ethanol was added to the clear lysate and mixed by pipetting four times. The mixture was then transferred to the spin column assembly and spun at 13,000 rpm for 1 min. The rest of the protocol followed procedure E (RNA purification by centrifugation) of the kit manufacturer (Promega). Total RNA was extracted from cassava storage roots using the method of Chang et al. (1993).

Ten micrograms total RNA per lane was electrophoresed on a 1.5% agarose gel containing formaldehyde and blotted onto a nylon membrane (Hybond N+, Amersham), according to standard procedures (Sambrook et al., 1989). Hybridizations were carried out at 65°C overnight, after which membranes were washed at a final wash stringency of 0.2X SSC, 0.2% SDS for 20 min at 65°C. The membranes were then exposed to Fuji X-ray film and incubated at -70°C, and the autoradiograph was then developed.

The nucleotide sequences described here have been submitted to the GenBank database and given the accession numbers AY946045-AY946084.

RESULTS

PCR amplification of cassava En/Spm transposase fragment, cloning and sequence analysis

PCR was carried out as described in the Material and Methods section above. The

amplified products were analyzed by electrophoresis on ethidium bromide stained 1.0% agarose gels (Figure 2).



Figure 2. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of *En/Spm*-like transposase fragment from cassava genomic DNA. The PCR product was run on a 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide. The size marker (lane M) is Bioline DNA 100-bp ladder while the PCR product for 50- and $100-\mu$ L reaction mixes are shown in the right lanes.

Approximately 650-bp putative fragments of the transposase domain were amplified in PCR. The DNA band was gel purified, and the purified DNA was sequenced directly using the PCR primers. The PCR product sequence was then submitted to BLASTN and TBLASTX searches. These confirmed that an *En/Spm*-like transposon fragment had been amplified in the PCR experiments. The cassava element was 67% identical (within the region of the alignment) to the *En/Spm*-like transposon of *Daucus carota* (accession number AB071202) at the amino acid sequence level (Figure 3). The cassava sequence (*Me*) had unresolved ambiguous nucleotides within the overall sequence. This ambiguity suggested that the PCR band represents a population of diverse individual members of *En/Spm*-like transposons. Subsequent to cloning, randomly selected clones were fully sequenced. These sequences showed clear homology to the transposase of *En/Spm*-like transposons (in most cases E-values from BLAST searches were in the region of E⁻⁶³).

```
    Me: 103 ICRRPEIKKOPISGKYPKACYCIDNOSIMILCOWLKTXKFPDGYVSNIGRCVDSRKIRLF 282
+CRRPEL D + KYPKACY LD + K +C WL+ KFPDGYVSNIGRCHD +K +LF
    Dc: 132 ICRRPEIAIDESTRKYPKACYSLDKKGKEAVCKWLQDIKFPDGYVSNMGRCHMKKYKLF 311
    Me: 283 GMKSHDCHVFMQR 321
GMKSHDCHVFMQR
    Dc: 312 GMKSHDCHVFMQR 350
```



Phylogenetic analysis

The nucleotide sequences of 40 unique clones representing cassava *En/Spm*-like transposons (*Meens*) were aligned using CLUSTAL W and highlighted in GENDOC version 2.3 (Figure 4). The alignment showed that there is a high degree of nucleotide sequence conservation among the cassava *En/Spm*-like transposons with overall identity in the range of 68-98%.

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

M.A. Gbadegesin and J.R. Beeching

Leene 32 ·	AT A DAY A DAY A DAY A DAY A	TTEACAATATITTTA/	ALC:NOA CO	In the second second	AAAACACAATATA	North Contractor		· 100
weensse .	A-A				A STATE OF TATA			. 100
Meens41 :	of other constants of the	TEACAATATTITTA	TAUGGICATIGA	TGTGGAGGGGVAAGAC	AMAGAGAGATATA	ana i ca de leatate		: 100
Meens39 :	ATATTAAAAAGAATGT2A	I I GAGAATAT II I I AA	ATAUGGICATGA	AT GT GCAGGGAAAGAC	AAAAGAGAATATA	SAATCACCIGAAG	ATTIANCIWAZO	: 100
Meens42 :	ATATT AAAAGAATGTA	TTGAGAATAT	TAUGGT CATGA	AT GT G G A G G G A A G A C	DAAAAGACAATATAJ	AATCACCIGAAG	GITTERACIANCOL	: 100
keens4 :	ATATTAAAAAGAATGTA	TTGAGAATATTTTTAA	TAUGGICATCA	TGTGGAGGGAAGAC	DAAAAGACAATATAJ	AATCAOGIGAAG	ATTERNOTA A CT	: 100
keens11 .	ATTATTAAAAAGAATGTAA	TIGACAATATITTTA	TAUGGUGATICA	TGTGGAGGGAAGAG	AAAAGACAATATAA	AATCAGGICAAG	ATTERACIA/VCI	· 100
Leene 22	A.A.B. ARAMAN 2011							100
Meens23 :	A PATE A BAR A COAT OF MA	THEACEOATATITITIE	Charles Carlos	IT GI GGAGGGAAAGAG	JUGALAGALATIATA	CONT CALCED CALLS		. 100
Meens9 :	ATM TWARAAGAATG 1224	I I GAGAATATI II I I AV	ATAUGGTCATCA	AT GT GGAGGGAAAGAC	DAAAAGAGAATATAJ	MATCAOOIGAAG	ATTTANCIWA/CI	: 100
Meens37 :	ATATTAAGAAGAATGTAA	TTGAGAATAT TTTA	TAUEGTCATCA	AT GT G GA G C G A A G A C	MANAGAGAATATA/	MATCACOUGAAG	ATTE AROLAZOT	: 100
keens31 :	ATATT 2AAAAGAATGT 2A	TTEACAATAT	TAUGGTCATCA	TGTGGTGGGGAAGAC	DAAAAGACAATATAJ	AATCAGGIGAAG	ATTIANCINAZOT	: 100
keene15	ATTOM AND A DATE OF A	TTGAGAATATTTTTA/	ANGRICATON	TOTOGACCONASCAC	MAAACACAATATA	NATO/OCT AND	ALLERGISCHARDAL	100
Neclisio .	A-A				AND A CACANTATATA			. 100
Meens40 :	of part is consumed as the type	TTEACAATATTITTA	anauegricarica	I GI GGAGGG AAGAC	AMAGAGAGATATA	GATLACEIGAAG	ATT DATE HARRIE	: 100
Meens19 :	ATAT PAAAAGAATG PA	I I GAGAATAT I I I I AA	TAUGGICATIGA	AT GT GGAGGGAAAGAC	JAAAAGAGAATATAJ	MATCACCIGAAG	ATTTAACIAAAAT	: 100
Meens16 :	ATATTAAAAAGAATGTAA	IT GA GAATAT TITTA	TAUEGICATGA	AT GT G G A G G G A A A G A G	DAAAACACAATATAJ	AATCAEGUGAAG	ATTUARCIAAAAU	: 100
Meens27 :	AUATTAAAAAGAATGTAA	IT GA GAATAT TITTAA	TALEGICATEA	AT GT G G A G G G A A G A C	DAAAAGACAATATAJ	AATCAOGIGAAG	ATTHAACIAAAAI	: 100
beens18 ·	AGATTEAAAAGAATGTAT	TIGAPAATATIIITAA	TADAGLICATICA	I GIUGACCCCAAGAC	GAAAGACAAAAAAAAA	AATCALCGEAAG	ATTLANATCANAT	. 100
Mechano .								. 100
Meensza :	ACAT CARAGAATG A	THEASAATATTITLA	dadwei earrea	I GIT GAGGGGGAGAGAG	CADALGALGATATAG	CONTRACTOR DE	ATT GVALCOVA	: 100
Meens25 :	AGAT GAAAAGAATGTAL	I I GAZAATAT II I I AA	UNDAGI COCTO	AT GTU GAGGGGAAGAC	CANAGACANTATA	WALCAY GODAAG	ATT PANALWARA	: 100
keens45 :	AGATIGAAAAGAATGIAT	TTGAQAATATIII TIAA	ATADAGTCATGA	AT GT G G A G G G C A A G C C	MANAGAGAATATA/	MATCANGEGAAG		: 100
Meens5 :	AGATTGAAAGGAATGTAT	ITGA?AATATITTTAA	TATAGTTATCA	TGTGGAGGGGAAGAC	DAAAAGACAATATAJ	AATCA, GREAAG	ATTHANATIGANAT	: 100
keensd6 '	AGATTEAAAAGAATGTAT	TIGADAATATTITTAA	INTACITATICA	TGTGGAGGGGAAGAG	AAAAGACAATATAJ	AATCALGGGAAG	ATTRASALIGASAL	100
henne 40	Act and the discourse	TTCADA ATATATTATA		the strength in the	A A A A CAR ANTA TO	A TOLL OF ME	ATTER DATE AT	100
MCChS40 .		THE POLICY AND THE POLICY		en en elektretet elektretet				. 100
Meens4/ :	A GATT GARARGAATGTAL	TIGA AATATTITTA	CIADAGI HATIGA	TGTGGAGGGGGAAGAC	AAAAGAGAGATATO	GATCA, GOGAR	ATTIANATCANA	: 100
Meens44 :	AGATIGAAAAGAATGIAU	I I GAVAATATI I I TAA	ATAGAGTIJATGA	ATGIGGAGGGGGAAGAC	DAAAAGACAATATO	LAATCA, GEGAAG	ATTIAAAIGAAAI	: 100
Meens20 :	AGATTGAAAAGAATGTAL	TTGAZAATATTTTTA	TAC GUIATGA	AT GT G GAGGG GAAGAC	DAAAAGACAATATG	LAATCA, GEGAAG	ATTEAAAIGAAAI	: 100
Meens24 :	ADATTRAAAAGAATGTAT	TTRAZAATATTTTTAA	TACAGITATCA	TGTGGAGGGGAAGAG	DAAAAGACAATATO	MATCA GREAAG	ΑΤΤΙΑΛΑΤΘΑΛΑΤ	: 100
beened3 ·	ACCTUCA ACCOUNT OF	TTEADAATATTTTTA	A A DA PHILA COM	TRUCCARECOASCAR	MAAACACAATATA	ANTERA COLAR	ATTERANTICASAT	. 100
heene21	A-A				A A A A CACANTATA	A		. 100
Neenszi :	A GATT GAAAAGAATGTAT	THEASAATATTTTTA	anadsectmentes.	TGTGGAGGGGGAAGAC	AVMAGAGAGATATA	MATCA: GCBAAB	ATTIAGVOTICANO	. 100
Meens28 :	AGATTGAAAAGAATGTAL	I I GAVAATAT II I TAA	ATAG-GITIAI GA	ATGTGGAGGGCARCGC	AAAAGAGAATATAJ	MATCALCCAAAG	ATTTANATIGANAT	: 100
Meens7 :	AGATTGAAAAGAATGTAJ	TTGAQAATATITTTA	TAGAATTATGA	AT GT G G A G G G C A A G A C	GAAAGACAATATAJ	LAATCA, GEGAAG	ATTUANAUGANAU	: 100
Meens33 :	AGAATGAAAAGAATGTAU	ITGA AATATITTAA	TAGAATTATGA	ATGTGGAGGGGAAGAC	GAAACACAATATAJ	AATCA. GGGAAG	ATTEAAAUGAAAU	: 100
keens10 :	AGATEGAAAAGAATGEAT	TIGA AATATITITAA	TATAATTATCA	TGTGGAGGGGAAGAC	TAAAAGACAATATA	AATCAAGGGAAG	ATTHANATIGAAAT	: 100
heene26 ·	Act not be a state	TIGADAATATUTTAA	ATA/RITARA	Inter Cerches	AAAAGACAATATA	ANTONACOCANC	ATTELANCICANAL	- 100
Mechazo .						A		. 100
MCCOSI4 ;	A CALL CONCARGAAT G FAL	TTGA/SCATATITT AU	dadwe harrea	TGTGGAGGGGGAGAGAC	ALCAUSA LOST AT AS	SALCA COMME	ATT MANOT COMPA	: 100
Meens34 :	AGATTEAAAAGAATGTAL	TTGAZAATATI TTAA	ATAGACITIAT CA	ATGT GCAGCGCAAGAC	AUAAGAGAAATATA	MATCALGREAAG	ATTIANATICANAT	: 100
keens12 :	AGATTGAAAAGAATGTAU	TTGAZAATATI TTAA	ATAGAATICAT (60	AT GT G G A G G G G A A G A G	MANAGAGANTATA	MATCAMAGEMAG	ATTEAAATEAAAT	: 100
Meens17 :	AGATTGAAAAGAATGTAT	TTGA@AATAT	TATAGICATGA	COTGGAGGGGAAGAC	DAAAAGACAATATAJ	AATCAATCGAAG	ATTHANALIGANAL	: 100
keens35 :	AGATTGAAAAGAATGTAT	TTGA AATATTTTTAA	TAGACICATICA	TGTGGAGGGGAAGAC	DAAAAGACAATATAJ	AATCA GREAAG	ΑΤΙΠΑΝΔΙΙΘΑΛΑΤ	: 100
henneß '	Acon acon concomentation	TTGADAATATOMTGA	CALTERNAL CO.	THE PARTY AND THE	ANA CONTRACTOR	Marchusesett	CONCIANCTON	100
henne??	Red meter laboration			COLUMN CONTRACT	Whenthemeed	Bornth code	CONTRACTOR	100
	A AT I AAAagAAtgia	TIGA AATA ITT ITA/	u Ac gT AtgA	nt GTgGaGGG AagaC	aaAaGAcAATat a	MATCA g gaAg	attiaA I aa I	
keens32 : keens41 :	A ALI ABABGAALGIB ATCTACAACACACACATTI ATCTACAACACACACATTI		ALCOCCARACTA	nt GTgGaGGG AagaC TGC/AAAGD/AGTTAT	aaAaGACAATataa	AATOAAACATCTT ATOAAACATCTT		: 200 : 200
keens32 : keens41 : keens39 :	A ALL ABABGAALGTB		UAC DI ALDA	107 AAACO ACTAT 107 AAACO ACTAT 107 AAACO ACTAT	aaaa Gacaa Lat a I GL I GEZOV AG I GL I GEZOV AG	AATCA g gaAg ATCAAAGATCTT ATCAAAGATCTT ATCAAAGATCTT		: 200 : 200 : 200
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 :	A ALT ASASGAN GIS (TI A & CARAIN (TI A & CARAIN (TI A & CARAIN (TI A & CARAIN		u Ac gT AtgA	10 00000 Acti Ati 10 00000 Acti Ati 10 00000 Acti Ati 10 00000 Acti Ati 10 00000 Acti Ati		ATOAAACATCT ATOAAACATCTI ATOAAACATCTI ATOAAACATCTI	ACIGICICATIGG ACIGICICATIGG ACIGICICATIGG ACIGICICATIGG	200 200 200 200
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 :	A ALT ASASSATSIS		uAc gT AlgA			AATCA g gaAg ATCAAACATCT ATCAAACATCT ATCAAACATCT ATCAAACATCT	ACIGICICATIGO ACIGICICATIGO ACIGICICATIGO ACIGICICATIGO ACIGICICATIGO	200 200 200 200 200
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 : keens4 :	A ALL ABABBANGIA TT AAG AAGATT CT AAG AAGATT CT AAG AAGATT CT AAG AAGATT TT AAG AAGATT		uAc gT AlgA	100400400700000000000000000000000000000		AATCA g gaAg ATCAACA T ATCAACA T ATCAACA T ATCAACA T ATCAACA T ATCAACA T	ACTIGICATICG ACTIGICATICG ACTIGICICATICG ACTIGICICATICG ACTIGICATICG ACTIGICATICG	: 200 : 200 : 200 : 200 : 200
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 : keens42 : keens4 :			u Ac gT At gA	I GIGGAGGA AagaC COLAMAGO A GILAT COLAMAGO A GILAT COLAMAGO A GILAT COLAMAGO A GILAT COLAMAGO A GILAT		AATCA g gaAg A AATCA T A AATCA T A AATCA T A AATCA T A AATCA T A AATCA T		: 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200
heens32 : heens41 : heens39 : heens42 : heens4 : heens11 : heens23 :	A ALL ABABABAALGIA CT A C C ACA U CT A C C ACA U		u Ac gT At gA	100, AAA CO A CT AT 100, AAA CO A CT AT		AN CAANGA TT AT CAANGA TT		: 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens11 : heens23 : heens8 :			u Ac gT At gA	100,404,00,401,41 100,404,00,401,41 100,404,00,401,41 100,404,00,401,41 100,404,00,401,41 100,404,00,401,41 100,404,00,401,41 100,404,00,401,41		MI CAMOAITI MI CAMOAITI MI CAMOAITI MI CAMOAITI MI CAMOAITI MI CAMOAITI MI CAMOAITI MI CAMOAITI MI CAMOAITI	ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO	: 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200
heens32 : heens41 : heens39 : heens42 : heens42 : heens11 : heens23 : heens37 :			the gT AtgA			AN CAMPA T AN CAMPA T	ACTOTOTOTATIOG ACTOTOTOTATIOG ACTOTOTOTATIOG ACTOTOTOTATIOG ACTOTOTOTATIOG ACTOTOTATIOG ACTOTOTATIOG ACTOTOTATIOG ACTOTOTOTATIOG	: 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200 : 200
heens32 : heens33 : heens42 : heens42 : heens42 : heens11 : heens23 : heens37 : heens37 :						AN CA 9 99A9 AN CAMCA T AN CAMCA T	ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
heens32 : heens33 : heens33 : heens42 : heens11 : heens23 : heens23 : heens37 : heens37 : heens31 :						AN CA 9 99A9 AL AMGA T AL AMGA T	ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION ACTORECATION	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
heens32 : heens41 : heens39 : heens42 : heens41 : heens11 : heens23 : heens37 : heens37 : heens15 : heens15 :			u Ac gT At gA				ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG ACTGTGTGATTGG	: 200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
heens32 : heens31 : heens42 : heens42 : heens41 : heens11 : heens23 : heens37 : heens37 : heens31 : heens15 : heens15 :			u Ac gT At gA			AN CAANGA (T M CAANGA (T)	ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTO ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO ACTOTOTOTOTOTO	: 200 : 200
heens32 : heens41 : heens39 : heens42 : heens42 : heens23 : heens37 : heens31 : heens15 : heens18 : heens19 :							ACTG ICICATI GG ACTG ICICATI GG	: 200 : 200
heens32 : heens31 : heens43 : heens42 : heens43 : heens11 : heens33 : heens37 : heens31 : heens15 : heens46 : heens16 :						Analica g gaag Mi aamiga (1)	ACT OF CICATT OF ACT OF CICATT OF	: 200 : 200
Meens32 : Meens41 : Meens39 : Meens42 : Meens42 : Meens23 : Meens9 : Meens31 : Meens31 : Meens15 : Meens16 : Meens16 : Meens27 :						A CAMPA CITAL CITA	ACT GT GT GATT GG ACT GT GT GATT GG	: 200 : 200
heens32 : heens31 : heens42 : heens42 : heens11 : heens33 : heens37 : heens37 : heens37 : heens15 : heens15 : heens16 : heens18 :						Analica g gaag Miradia a	ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCATT OF	: 200 : 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens4 : Meens4 : Meens9 : Meens9 : Meens9 : Meens11 : Meens13 : Meens15 : Meens16 : Meens18 : Meens18 : Meens29 :							ACT GT GT GATT GG ACT GT GT GATT GG	: 200 :
heens32 : heens31 : heens33 : heens42 : heens42 : heens31 : heens33 : heens37 : heens37 : heens15 : heens16 : heens16 : heens27 : heens28 : heens25 :							ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCATT OF	: 200 : 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens4 : Meens433 : Meens23 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens15 : Meens16 : Meens18 : Meens27 : Meens28 : Meens25 : Meens25 : Meens25 :						An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An I A M GA I A M GA An A M GA I A M GA	ACT GT GT GATT GG ACT GT GT GATT GG	: 200 :
heens32 : heens31 : heens33 : heens42 : heens42 : heens23 : heens31 : heens31 : heens31 : heens15 : heens16 : heens18 : heens28 : heens28 : heens25 : heens45 : heens45 : heens45 :						Analica () Analia Analia Analia	ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCA	: 200 : 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens23 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens27 : Meens28 : Meens25 : Meens5 :							ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCA	: 200 :
heens32 : heens41 : heens43 : heens43 : heens42 : heens23 : heens93 : heens31 : heens15 : heens16 : heens16 : heens18 : heens28 : heens25 : heens5 : heens5 : heens5 : heens5 :							ACTG IGIGATI GG ACTG IGIGATI GG	: 200 : 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens433 : Meens313 : Meens313 : Meens314 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens27 : Meens48 : Meens27 : Meens45 : Meens46 : Me						A CANGA CI A AMGA CI A AMG	ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCATT OF	: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens31 : Meens331 : Meens41 : Meens41 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens45 : Meens45 : Meens46 : Meens46 : Meens47 :							ACT GIG CICATT GG ACT GIG CICA	: 200 : 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens23 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens43 : Meens43 : Meens44 : Meens45 : Meens45 : Meens45 : Meens45 : Meens46 : Meens47 : Meens44 :						A CANCA A A A A A A A A A A A A A A A A	ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCA	: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens23 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens16 : Meens16 : Meens27 : Meens28 : Meens25 : Meens45 : Meens46 : Meens40 : Meens41 : Meens4							ACT GT GT GATT GG ACT GT GATT GG ACT GT GT GATT GG ACT GT GT GATT GG ACT GT GT GATT GG ACT GT GATT GG ACT GT	: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens4 : Meens23 : Meens23 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens45 : Meens45 : Meens45 : Meens46 : Meens46 : Meens46 : Meens47 : Meens20 : Meens24							ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCATT OF ACTO OF CITCATT OF ACT OF CITC	: 200 :
heens32 : heens41 : heens39 : heens42 : heens42 : heens23 : heens9 : heens9 : heens31 : heens16 : heens16 : heens18 : heens25 : heens42 : heens45 : heens46 : heens40 : heens41 : heens41 : heens41 : heens42							ACT GIG CATTOG ACT GIG CATTOG	: 200 :
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens42 : heens53 : heens53 : heens53 : heens53 : heens515 : heens64 : heens65 : heens65 : heens65 : heens65 : heens65 : heens65 : heens66 : heens67 : heens74 : heens74 : heens75 : heens75 : heens75 : heens76 : heens76 : heens76 : heens76 : heens77 : heens76 : heens77 : heens77 : heens77 : heens77 : heens78 : heens77 : heens								: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens4 : Meens4 : Meens23 : Meens9 : Meens9 : Meens9 : Meens13 : Meens15 : Meens16 : Meens16 : Meens27 : Meens28 : Meens25 : Meens25 : Meens46 : Meens47 : Meens47 : Meens47 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens43 : M							ACT GT GT GATT GG ACT GT GT GA	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens43 : Meens53 : Meens53 : Meens53 : Meens531 : Meens54 : Meens46 : Meens47 : Meens45 : Meens45 : Meens45 : Meens40 : Meens40 : Meens41 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens48 : Meens43 : Meens48 : Meens43 : Meens48 : Meens48 : Meens43 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens43 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens43 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens41 : Meens43 : Meens48 : Meens						A CONCE A A AMERICA I A AMERIC		: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens937 : Meens937 : Meens931 : Meens931 : Meens15 : Meens16 : Meens18 : Meens28 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens43 : Meens43 : Meens24 : Me						A CANCA A A AMAGA C A AMAG	ACT GIG CICATT GG ACT GIG CICA	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens43 : Meens53 : Meens53 : Meens53 : Meens53 : Meens54 : Meens46 : Meens47 : Meens45 : Meens45 : Meens45 : Meens45 : Meens46 : Meens40 : Meens41 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens44 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens44 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens44 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens43 : Meens44 : Meens43 : Meens44 : Meens43 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens4								: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens11 : Meens133 : Meens13 : Meens13 : Meens14 : Meens15 : Meens16 : Meens16 : Meens25 : Meens25 : Meens25 : Meens46 : Meens47 : Meens46 : Meens47 : Meens41 : Meens41 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens43 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens43 : Meens						A CANCA A A A A A A A A A A A A A A A A	ACT GIG CIGATI GG ACT GIG CIG CIG CIG CIG ACT GIG CIG CIG CIG CIG ACT GIG CIG CIG CIG CIG ACT GIG CIG CIG CIG ACT GIG CI	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens43 : Meens53 : Meens53 : Meens53 : Meens54 : Meens548 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens49 : Meens49 : Meens49 : Meens45 : Meens45 : Meens40 : Meens40 : Meens41 : Meens41 : Meens43 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens45 : Meens45 : Meens45 : Meens46 : Meens46 : Meens46 : Meens47 : Meens48 : Meens			TAKE of Atlant					: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens31 : Meens93 : Meens931 : Meens15 : Meens16 : Meens18 : Meens27 : Meens28 : Meens42 :						A CANCA A A AMAGA C A AMAG	ACT GIG CIGATI GG ACT GIG CIG CIG CIG CIG CIG ACT GIG CIG CIG CIG CIG CIG ACT GIG CIG CIG CIG CIG CIGA	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
heens32 : heens31 : heens33 : heens42 : heens42 : heens33 : heens33 : heens331 : heens331 : heens348 : heens48 : heens48 : heens48 : heens49 : heens49 : heens49 : heens49 : heens45 : heens45 : heens45 : heens40 : heens41 : heens42 : heens42 : heens42 : heens43 : heens42 : hee			TANK DI AL DA			A CANCA A A AMAGA CI A		: 200 :
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens42 : Meens42 : Meens23 : Meens931 : Meens31 : Meens31 : Meens15 : Meens16 : Meens18 : Meens27 : Meens48 : Meens27 : Meens42 : Meens45 : Meens46 : Meens46 : Meens40 : Meens41 : Meens41 : Meens20 : Meens21 : Meens21 : Meens22 : Meens23 : Meens23 : Meens23 : Meens24 : Meens24 : Meens24 : Meens24 : Meens25 : Meens25 : Meens26 : Meens26 : Meens23 : Meens23 : Meens23 : Meens23 : Meens23 : Meens24 : Meens24 : Meens24 : Meens25 : Meens25 : Meens26 : Meens26 : Meens26 : Meens26 : Meens27 : Meens28 : Meens						A CANCA A A AMAGA C A AMAG	ACT GIG CIGATI GG ACT GIG CIG CIG ACT GIG CIG ACT GIG CIG ACT GIG CIG CIG ACT GIG CIG ACT	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens43 : heens133 : heens131 : heens131 : heens131 : heens148 : heens148 : heens15 : heens25 : heens25 : heens25 : heens25 : heens46 : heens47 : heens48 : heens47 : heens48 : heens41 : heens42 :						A A A A A A A A A A A A A A A A A A A		200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens4 : Meens23 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens27 : Meens18 : Meens28 : Meens27 : Meens46 : Meens46 : Meens46 : Meens40 : Meens40 : Meens41 : Meens41 : Meens41 : Meens42 : Meens43 : Meens44 : Meens44 : Meens44 : Meens45						A CANCA A A AMAGA I A AMAG	ACT GIG GIGATI GG ACT GIG GIG ATI GG ACT GIG GIG GIG GIG GIG ACT GIG GIG ATI GG ACT GIG GIG ATI GIG ACT GIG GIG ATI GIG ATI GG ACT GIG GIG ATI GIG ACT ATI GIG ATI GIG ACT GIG ATI GIG ATI GIG ACT GIG AT	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
heens32 : heens31 : heens42 : heens42 : heens43 : heens13 : heens33 : heens331 : heens331 : heens331 : heens48 : heens48 : heens48 : heens49 : heens49 : heens49 : heens40 : heens40 : heens41 : heens41 : heens41 : heens41 : heens42 : hee			TANGA IN A CALL					200 200 200 200 200 200 200 200 200 200
Meens32 : Meens41 : Meens42 : Meens4 : Meens23 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens31 : Meens48 : Meens48 : Meens48 : Meens27 : Meens18 : Meens28 : Meens28 : Meens5 : Meens46 : Meens40 : Meens40 : Meens40 : Meens41 : Meens20 : Meens21 : Meens21 : Meens21 : Meens23 : Meens23 : Meens24 : Meens24 : Meens23 : Meens24 : Meens23 : Meens34 : Meens34 : Meens34 : Meens34 : Meens32 : Meens32 : Meens34 : Meens32 : Meens32 : Meens32 : Meens33 : Meens34 : Meens34 : Meens34 : Meens35 : Meens35 : Meens37							ACT OF CITCATT OF ACT OF CITCA	2000 2000 2000 2000 2000 2000 2000 200
heens32 : heens31 : heens33 : heens42 : heens42 : heens31 : heens33 : heens33 : heens331 : heens331 : heens331 : heens48 : heens48 : heens48 : heens48 : heens49 : heens49 : heens40 : heens40 : heens40 : heens41 : heens41 : heens41 : heens42 : hee							ACT OF CICATT OF ACT OF	200 200 200 200 200 200 200 200 200 200

at G ag aGaCcAGAaTTgaagAaaGAt CcAaT agogg AaaTaTccaAAAgCa gTt ATt gTt t gGA Aa AAt c AAG t g TacTgt GTGATTgg

Continued on next page

©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

644

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

Figure 4. Continued.

Meens32 :	CT CAAAACACT AAAATTO	CCCITATCAATATGT	TCCAATCTAGCGAGATGTGTT	CTACTCC/AAGCITAGAC	TATTAGCTATCAAA CGOTACCACTGTC	: 300
keens41 :	CT CAMAGACT/MAATTO	CCCITIATCAATATGIT	TCCAATCIAGOGAGATGIGIT	GTAGTCG2AAGCTTAGAC	IMITAGGIATGAAACGOTACGACIGIC	: 300
Meens39 :	CICAMADACIAMATIC	CONTATIONATATION	TCCAATCTAGGGAGATGTGTT	GTAGTCGASAGCTTAGAC	IMITIAGEI ATGAAAAGDIACGADI GID	: 300
Meens42 :		COTTATCAATATGT	TECAATETAGGGAGATGTGTT	IGI AGI CGANAGCI TAGAC	A CONTRACTATION AND A CONTRACTATION	: 300
Meens4 :		CONTRACTOR OF	TECAATETAGGGAGATGTGTT	IGI AGI CGAGAGCI TAGAC	TAT ABGI ATGAAAAGDTACCACTETC	: 300
Accusti .	CT CANADA CA CT ANA ATT	COLUMN AND A DATA	TCCAALCIACGEAGATGIGIU	GIACTOCAACCUTACAC	ATTACCTAT CAASA CONACCA CITCLE	. 300
keens9 :	CICAAAACACTAAAATTO	COLUMN CANINEGU	TCCAATCLAGGGAGATGIGTT	GLACICCAAACCITACAC	IAILIA CELATEMA ACOLA CEACLETE	: 300
heens37 :	CTGAAAADACTQAAATTO	CONTRACTOR IN	TECANTELAGGAGATGIGIT	GTACTCC AACCITACAC	INTINCE ATGAMAGOTACCACTOR	: 300
keens31 :	CTGAAAACACTQAAATTO	CONTATICAATATGTT	TECAATETAGGAGATGTETT	GTAGTCG2AAGCTTAGAC	TATTACCTATCAAAACOTACCACTGTC	: 300
Meens15 :	CT CAAAACACT AAAATTO	CONTRACCONTATOTT	TCCCATCTAGOGAGATGTGTT	ATAGTCGAAAGCTTAGAC	TATTTACTAGGAAAAAATOACGACTUTC	: 300
Meens48 :	CT CAAAACACT AAAATTO	CONTRACEGATATETT	CCCCATCTAGOGAGATGTGTT	ATAGTCGAAAGCTTAGAC	TATTTACTACGAAAAATOACGACTITC	: 300
Meens19 :	CTCAAAACACTAAAATTO	CONTRACEGATATEIT	TCOCATCTAGOGAGATGTGTT	TAGTCGAAAGCTTAGAC	TAITTACTACGAAAAATOACGACTITC	: 300
Meens16 :	CTGAAAACACTAAAATTO	COCTHACGGATATGIT	TCCCATCIAGOGAGATGIGII	SATAGTCGARAGCITAGAC	TAITTAGTAGGAAAAATGACGACTITIC	: 300
Meens27 :	CTGAAAACACTAAAATTO	CCCHIACGEATATGIT	TCCCATCIAGOGAGATGIGII	SATAGTCGAAAGCITAGAC	TATTTACTACGAAAAAATOACGACTUTC	: 300
Meens18 :	CITIAAAACACTGAAATTO	COLICATIGUE	TCCAATCIAGOGAGATGIGII	ATAGICAGAAGCIMAGAC	THITHECTATGAAAAHCOACGACIGIC	: 300
Meens29 :	CICAMACACITIAMATTI	CICLEAL CEALAINI GI	TCOAATCI A2GOA2ATGI GI I	ATAGICGGAAGCHAAGAC	IIIIIII GCTATGAAAAGQIACGACI GIC	: 300
Meens25	CITIZE CONTRACTOR OF CONTRACT	COLONICATINI GI	TECAATETAGGGAGATGTGTT	AMAINERCANACITAMENT	THEFT	: 300
Meens45	CTTRADACT COART TO	CONSALIGATIAT GIT	TECATETAGGAGAGATGIGIT	TAGTO AGAGAGO TAGAC		: 300
keenso .	CTURNER CONTENT	COTCACCCATUTOT	TCCAATCTACCCACATCTCTT	STACTOGAAGCITACAC	THITHGETATGAAAAGCAACGACTGIC	. 300
keens40 .	CITIAAAA CACTICAAATTU	COLGACCEATING I	TOCANTOTAGGAGATGURIT	TACTOCAACCUTACAC	ULTIDETATEAAAAGOACEACUGUC	- 300
keens47	CITIAAAACACTGAAATTO	COLGAOCGATHEGH	TCCAATCIAGGAGATGIRIT	TAGTCGCAAGCITAGAC	THETHOGTATCAAAAGCOACCACIGIC	: 300
Meens44 :	CITIAAAACACTGAAATTG	COLGAOCGATHIGH	TCCAATCTAGGGAGATGT	TAGTCGGAAGCITAGAC	THETHOGTATGAAAAGCOACGACTGEC	: 300
Meens20 :	CTHAMAACACTGAAATTO	CCCLEACCEATHIGHT	TCOANTCIACGAGATGIGIT	ATAGTCGGAAGCITAGAC	THEFTECTATGAAAAGCGACGACTGTC	: 300
heens24 :	CTTAAAACACTGAAATTO	COCTGACAGATITGIT	TCOATCIAGOGAGATGIGIT	TAGTCGGAAGCTTAGAC	TUTTUECTATGAAAAGCOACGACTETC	: 300
Meens43 :	CTIAMACACTOMATTO	CCCTCACCCATTITCTT	TECAATETAGGGAGATGTETT	TAGTOGOAGCITAGAC	TUTTUGCTATGAAAAGCOACGACTGTC	: 300
Meens21 :	CTHAMACACTGAAATTO	CONTRACCONTINUE	TCCAATCTAGGGAGATGTGTT	TAGTCG GAAGCTTAGAC	TUTTUGCTATGAAAAGCAACGACTGTC	: 300
Meens28 :	CTHAMAACACTGAAATTO	CCCTCACCCATITGT	TCOAATCIAGOGAGATGIGIT	ATAGTCG GAAGCITAGAC	THTTHEGTATGAAAAGCGACGACTGTC	: 300
Meens7 :	CTHAAAACACTGAAATTO	CCCTCACCCATITICIT	TCCAATCIAGGGAGATGIGII	TAGTCGGAAGCITAGAC	THITHECTATGAAAAGCOACGACIGIC	: 300
Meens33 :	CITIAAAACACTCAAATTC	COLEACEEATITET	TCCAATCIAGGGAGATGIGII	GATAGTEGGAAGETTAGAE	IIIIIIIGCTATGAAAAGCOACGACIIGIIC	: 300
Meens10 :	CITIAAAADACIIGAAATTI	COLEADGEATHIGH	TCCAAICIAGGGAGATGIGII	STAGTCGGAAGCI TAGAC	TITTIGCTATGAAAAGCOACGACIGIC	: 300
Meens26 :	CITIZGOOLACTOGOOATTI	COLCACCEATING	TECAATCTAGGGAGATGTGTT,	CTAGTER GAAGETTAGAC	THTTECTATCAAAAGCOACCACIGIC	: 300
Accusia :	TTIANAA CUT CAASITT		TUCAATETACCEACATCIDIT	TACTOCCAACCUTACAC	THECTATCAASACCAACCACTETE	. 300
keenel2	CTUALAA CACTUALAATTI	ID OT CACCE AT AT CIT	TECANTELASCEASATCLETT	STACTOCAACCUTACAC	TUTTUEGTATGAAAAGCAACCACTETC	. 300
keens17	CITIZ CARA DE CITZ CARATIN	COLONICOTATATOT	TCCAATCIACGAGACATCIGIT	ATAGTCG BAGTITAGAC	TTUT CELATEAN ACCORDENDED	300
Meens35 :	CTTAAAACACTAAAATTI	ICCI GACCGATATOTT	TECAATCTAGGAGATGTGTT	ATAGTCGAAAGCTTAGAC	THETHOGTATGAAAAGCOACGACTGTC	: 300
Meens8 :	CIIGAAAAAATICIICAAACITII	TICLICATEGATATCH	TECAATATIGE COGAT GT ATT	ATTATGAAGAG COTIGAAGA	TETTIECCATGAAGAGTOATGACTGTC	: 300
Meens22 :	TICAAAAATCTCAACTT	ICCCGALIGGATATGIT	TCCAATAIIGGGGGGGATGTATT	ATATGAAGAAGCIIGAAGA	I GI I I I GETATGAAGAGI GAI I GAI I GI C	: 300
keens32 :			TORAAGATTIGTTAOTGAATAA	TGITTEACAACCAATAAC	Ασάσειτας σάτι ΠΗ Ασάσαση	: 400
keens32 : keens41 : keens39 :		ATTETTOCIATAGOTO ATTETTOCIATAGOTO				: 400 : 400
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 :					AGACCITACCAATITTTTTAGACAACT AGACCITACCAATITTTTAGACAACT AGACCITACCAATITTTTAGACAACT AGACCITACCAATITTTTAGACAACT	: 400 : 400 : 400
Meens32 Meens41 Meens39 Meens42 Meens4						400 400 400 400 400
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 : keens4 : keens11 :				ITGET I CALANCONTANC ITGET I CALANCONTANC ITGET I CALANCONTANC ITGET I CALANCONTANC ITGET I CALANCONTANC ITGET I CALANCONTANC		: 400 : 400 : 400 : 400 : 400 : 400
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 : keens4 : keens11 : keens23 :						400 400 400 400 400 400 400 400
keens32 keens41 keens39 keens42 keens4 keens11 keens23 keens9						: 400 : 400 : 400 : 400 : 400 : 400 : 400 : 400 : 400
heens32 : heens33 : heens33 : heens42 : heens4 : heens11 : heens23 : heens37 :						400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens4 : heens11 : heens23 : heens37 : heens31 :						400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
heens32 : heens41 : heens39 : heens42 : heens41 : heens11 : heens23 : heens9 : heens37 : heens31 : heens11 : heens15 :						: 400 : 400
keens32 : keens41 : keens39 : keens42 : keens4 : keens11 : keens23 : keens37 : keens37 : keens31 : keens48 : keens48 : keens48 :			ម្ភាស់ស្រុកម្មាស់ស្រុក សមត្ថក្រុមស្រុក សមត្ថក្រុមស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក ស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុកស្រុក			400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
Meens32 : Meens31 : Meens42 : Meens42 : Meens11 : Meens23 : Meens23 : Meens37 : Meens37 : Meens31 : Meens15 : Meens18 : Meens16 :						: 400 : 400
heens32 : heens31 : heens33 : heens42 : heens42 : heens11 : heens37 : heens37 : heens31 : heens15 : heens16 : heens16 : heens27 :						: 400 : 400
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens11 : heens13 : heens33 : heens37 : heens33 : heens15 : heens18 : heens16 : heens18 :						: 400 : 400
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens41 : heens13 : heens13 : heens33 : heens31 : heens31 : heens15 : heens13 : heens16 : heens18 : heens23 :						: 400 : 400
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens11 : heens23 : heens23 : heens37 : heens31 : heens31 : heens15 : heens16 : heens16 : heens18 : heens18 : heens28 : heens25 :						: 400 :
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens11 : heens23 : heens33 : heens37 : heens37 : heens38 : heens15 : heens18 : heens18 : heens27 : heens28 : heens2						400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens41 : heens13 : heens13 : heens33 : heens33 : heens31 : heens15 : heens16 : heens18 : heens23 : heens23 : heens23 : heens23 : heens24 : heens25 : heens5 : heens7 : heens6 : heens7 : heens6 : heens7 : he			24.00.00.00.00.00.00.00.00.00.00.00.00.00			400 400
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens11 : heens523 : heens37 : heens37 : heens37 : heens37 : heens38 : heens48 : heens18 : heens18 : heens28 : heens45 : heens						400 400
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens43 : heens33 : heens33 : heens33 : heens34 : heens35 : heens36 : heens48 : heens16 : heens48 : heens27 : heens27 : heens28 : heens28 : heens28 : heens28 : heens28 : heens5 : heens5 : heens40 : heens50 : heens40 : heens50 : heens40 : heens50 : heens50 : heens40 : heens50 : heens40 : heens50 : heens40 : heens40 : heens50 : heens40						400 400
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens4 : heens133 : heens13 : heens13 : heens31 : heens31 : heens31 : heens13 : heens13 : heens13 : heens23 : heens23 : heens23 : heens23 : heens23 : heens23 : heens23 : heens24 : heens46 : heens46 : heens47 : heens44 : heens4						400 400
heens32 : heens41 : heens39 : heens42 : heens12 : heens13 : heens33 : heens37 : heens37 : heens37 : heens16 : heens16 : heens16 : heens18 : heens18 : heens27 : heens28 : heens28 : heens28 : heens28 : heens29 : heens26 : heens27 : heens28 : heens2						400 400
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens42 : heens33 : heens33 : heens33 : heens34 : heens35 : heens35 : heens48 : heens19 : heens18 : heens27 : heens27 : heens28 : heens28 : heens28 : heens28 : heens41 : heens42 : heens5 : heens42						400 400 400 400
beens32 ; beens41 ; beens33 ; beens11 ; beens31 ; beens31 ; beens31 ; beens31 ; beens331 ; beens31 ; beens31 ; beens15 ; beens16 ; beens16 ; beens23 ; beens45 ; beens45 ; beens45 ; beens46 ; beens41 ; beens42 ; beens42 ; beens42 ; beens42 ; beens42 ; beens43 ;						400 400 400 400
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens13 : heens13 : heens33 : heens37 : heens37 : heens37 : heens16 : heens16 : heens16 : heens18 : heens29 : heens29 : heens21 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens43 : heens4						400 400 400 400
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens43 : heens53 : heens53 : heens53 : heens51 : heens16 : heens18 : heens18 : heens18 : heens18 : heens19 : heens18 : heens27 : heens23 : heens5 : heens5 : heens5 : heens40 : heens40 : heens41 : heens42 : heens42 : heens42 : heens43 :						400 400 2 400
beens32 : beens41 : beens42 : beens4 : beens11 : beens31 : beens31 : beens31 : beens331 : beens45 : beens16 : beens18 : beens23 : beens16 : beens27 : beens28 : beens46 : beens45 : beens46 : beens47 : beens41 : beens42 : beens43 : beens43 : beens24 : beens23 : beens24 : beens23 : beens24 : beens25 : beens26 :						400 400 400 400
beens32 : beens41 : beens42 : beens41 : beens41 : beens41 : beens41 : beens41 : beens531 : beens15 : beens16 : beens175 : beens29 : beens18 : beens27 : beens28 : beens45 : beens45 : beens45 : beens41 : beens42 : beens42 : beens43 : beens43 : beens21 : beens223 : beens231 : beens231 : beens231 : beens232 :						400 400 400 400
beens32 : beens41 : beens41 : beens41 : beens42 : beens41 : beens41 : beens41 : beens41 : beens42 : beens31 : beens31 : beens41 : beens41 : beens43 : beens45 : beens45 : beens45 : beens46 : beens47 : beens41 : beens21 : beens22 : beens23 : beens23 : beens33 : beens33 :						400 400 400 400
beens32 : beens41 : beens41 : beens41 : beens42 : beens41 : beens41 : beens42 : beens13 : beens33 : beens45 : beens16 : beens18 : beens23 : beens45 : beens45 : beens45 : beens45 : beens46 : beens47 : beens48 : beens41 : beens42 : beens43 : beens221 : beens321 : beens321 : beens321 : beens321 : beens321 : beens325 : beens331 : <td< td=""><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>400 400 400 400</td></td<>						400 400 400 400
heens32 : heens41 : heens33 : heens42 : heens42 : heens43 : heens53 : heens53 : heens53 : heens54 : heens15 : heens16 : heens17 : heens55 : heens54 : heens40 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens44 : heens43 : heens44 : heens43 : heens44 : heens4						400 400 400 400
beens32 ; beens41 ; beens41 ; beens42 ; beens41 ; beens41 ; beens41 ; beens41 ; beens43 ; beens31 ; beens45 ; beens46 ; beens48 ; beens48 ; beens48 ; beens45 ; beens46 ; beens47 ; beens48 ; beens41 ; beens22 ; beens23 ; beens24 ; beens21 ; beens22 ; beens23 ; beens23 ; beens23 ; beens23 ; beens33 ; beens24 ; beens31 ; beens34						400 400 400 400
weens32 : weens41 : weens42 : weens42 : weens41 : weens42 : weens41 : weens42 : weens531 : weens56 : weens16 : weens16 : weens16 : weens16 : weens27 : weens28 : weens45 : weens45 : weens46 : weens47 : weens48 : weens49 : weens41 : weens21 : weens23 : weens24 : weens25 : weens26 : weens27 : weens28 : weens21 : weens21 : weens3						400 400 2
heens32 : heens41 : heens42 : heens42 : heens43 : heens53 : heens53 : heens53 : heens53 : heens53 : heens14 : heens15 : heens16 : heens27 : heens28 : heens27 : heens28 : heens28 : heens27 : heens28 : heens28 : heens28 : heens40 : heens41 : heens41 : heens42 : heens42 : heens42 : heens43 : heens42 : heens42 : heens43 : heens44 : heens43 : heens43 : heens52 : heens43 : heens44 : heens43 : heens52 : heens43 : heens53 : heens44 : heens53 : heens44 : heens53 : heens44 : heens54 : heens55 : heens55 : heens16 : heens77 : heens56 : heens76 : heens7						400 400 2
weens32 ; weens41 ; weens42 ; weens42 ; weens41 ; weens42 ; weens41 ; weens41 ; weens13 ; weens15 ; weens16 ; weens16 ; weens27 ; weens28 ; weens45 ; weens46 ; weens47 ; weens48 ; weens41 ; weens22 ; weens23 ; weens24 ; weens23 ; weens23 ; weens23 ; weens23 ; weens23 ; weens24 ; weens25 ; weens24 ; weens25 ; weens33 ; weens24						400 400 400
weens32 ; weens41 ; weens42 ; weens42 ; weens41 ; weens42 ; weens42 ; weens42 ; weens531 ; weens15 ; weens16 ; weens16 ; weens16 ; weens27 ; weens28 ; weens45 ; weens45 ; weens46 ; weens47 ; weens48 ; weens41 ; weens22 ; weens31 ; weens21 ; weens33 ; weens23 ; weens33 ; weens33 ; weens33 ; weens33 ; weens33 ; weens33 ; weens3						400 400 2

Continued on next page

©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)



Figure 4. Multiple sequence alignment of the nucleotide sequences for 40 transposase fragments of cassava *En/Spm*-like transposons (*Meens*). The sequences were aligned using the CLUSTAL W program. Gaps (indicated with dashes) represent deletions in the sequence. Color blocking (done in GENDOC) indicates sequence conservation: Black = 100% identity, grey = 60-80% and non-shaded = <60% identity.

Study on the genomic organization and diversity of *En/Spm*-like transposons in cassava cultivars

In order to gain an insight into the genomic organization of the cassava *En/Spm*-like transposons, a representative cassava element, *Meens 5*, was used to probe a Southern blot of the DNA from 10 different cassava cultivars separately digested with *Bgl*II, *Hin*dIII and *Eco*RI

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

(see Figure 5). Strong signals were obtained, revealing the presence of multiple bands after a short exposure time, which suggests that many copies of *Meens* and relatives were integrated in the genome. Incomplete digestion of the genomic DNA was ruled out because the same gel blot probed with a well-characterized sequence showed only few distinct hybridizing bands (data not shown). The data also suggest that *Meens* 5 cross hybridizes with sequences highly homologous to the probe, represented by the strong major bands, as well as related diverged fragments, seen as weak signals. The digests did not reveal clear differences in the hybridization pattern between the cultivars tested (Figure 5, Panels a, b and c).



Figure 5. Southern blot analysis of *En/Spm*-like transposase of 12 cassava cultivars. Each cassava cultivar was carried out with 10 µg genomic DNA. *Lane 1* (MGA1), *lane 2* (MNGA2), *lane 3* (MDOM5), *lane 4* (MNGA19), *lane 5* (MCOL22), *lane 6* (CMC40), *lane 7* (MVEN77), *lane 8* (CG402), *lane 9* (SM627), *lane 10* (SM985), *lane 11* (SM1088), and *lane 12* (CM2177) were digested with *BgI*II (a), *Eco*RI (b) or *Hind*III (c). The digested DNAs were separated on 0.8% agarose gels, transferred to a nylon membrane and hybridized with the *Meens* 5 probe. *Hind*III-digested lambda DNA was used as a DNA size marker (M).

Methylation status and transcriptional activity of *En/Spm*-like transposons of cassava

To determine the methylation status of cassava En/Spm-like transposons, Meens 5 was used to probe Southern blots of the DNA from 10 different cassava cultivars digested with HpaII or MspI. The hybridization pattern in most cases showed a strong smear over a range of low to high molecular weights (Figure 6). These sequences were probably highly methylated as revealed by minor differences between the hybridization pattern of the HpaII and MspI digests. These two enzymes share the recognition nucleotide base sequence CCGG, but HpaII is blocked by methylation at either C, while MspI is blocked by methylated external C only. The finding here suggests the presence of only few unmethylated external cytosine residues in the sequence CCGG of cassava En/Spm-like transposons, and therefore completely or near completely methylated sequences. In addition, when Meens 5 was used to probe the Northern blot of total RNA prepared from cassava leaves and roots, as described in the Material and Methods section, there were no detectable signals in the hybridizations.

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

M.A. Gbadegesin and J.R. Beeching



FIGURE 6. Methylation status of *En/Spm*-like transposase of 12 cassava cultivars. A total of 10 μ g genomic DNA from each of the cassava cultivars (as in Figure 5) was digested with *HpaII* or *MspI*. The digested DNAs were separated on 0.8% agarose gels, transferred to a nylon membrane and hybridized with the *Meens* 5 probe. *Hind*III-digested lambda DNA was used as a DNA size marker (M).

DISCUSSION

Using PCR degenerate primers, cassava transposase fragments characteristic of En/Spm-like transposons were isolated, cloned and sequenced. Alignment of the nucleotide sequences of cassava En/Spm-like transposon clones (*Meens*) showed that there was a high level of nucleotide sequence conservation among the cassava elements. The alignment of the putative peptide sequence of representative *Meens* with known En/Spm-like transposons of other plants (data not shown) revealed identity at most positions that were conserved in the majority of the elements compared.

These findings for *Meens* are similar to those observed for the *En/Spm* transposons of *Arabidopsis thaliana, Solanum lycopersicum* and *Elaeis guineensis*. However, more diverged sequences of *En/Spm*-like transposons were reported for *Cicer arietinum* (Staginnus et al., 2001). An extreme case of divergence of *En/Spm* transposons within a plant has been reported for the nucleotide sequences of carrot (*Daucus carota*), where the *Tdc C* element was found to be highly divergent from the other two families, *Tdc A* and *Tdc B* (Itoh et al., 2003).

Our Northern blot hybridizations of total RNA did not produce detectable signals. This suggests that the cassava En/Spm-like elements are transcriptionally inactive or their transcripts were produced at such a low level that they were not detectable here. We found, from the deduced translations of the cassava En/Spm-like transposon-transposase, that 72.5% contain a frame shift, a nonsense mutation or both within the sequence analyzed. Therefore, the majority of these cassava enzymes would be non-functional and defective.

Southern blot analysis did not reveal clear differences in the hybridization pattern between the cultivars tested (Figure 5, Panels a, b and c, and Figure 6). The observations made with cassava elements, *Meens*, suggest that they have not been active during the recent history of cassava. The same restriction enzyme digest blots probed with cassava

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

Mutator-like transposable element (MULE) transposase cDNA show clear polymorphism among the same cassava cultivars (Gbadegesin et al., 2007). The hybridization pattern of the *Meens* in most cases, especially with the *Hpa*II or *Msp*I digestion of the genomic DNA, showed a strong smear over a range of low to high molecular weights (Figure 6). This indicates the presence of *Meen* 5 and homologues in many different genomic loci. These sequences were probably highly methylated as revealed by minor differences between the hybridization pattern of the *Hpa*II and *Msp*I digests. In contrast to the above, Southern analyses of the DNA digested by the isoschizomers, *Hpa*II and *Msp*I, revealed partial methylation sequences of cassava *Mutator*-like transposable elements for the same set of cultivars (Gbadegesin et al., 2007). These findings lend strong support to the association between decreases in DNA methylation and increased activity of transposable elements.

DNA methylation has tremendous effects on the heritability and activity of *En/Spm* (Banks et al., 1988). It is a key component of the mechanism that regulates transposition (Chandler and Walbot, 1986; Chomet et al., 1987; Fedoroff et al., 1995; Singer et al., 2001; Lisch et al., 2002). Transposons induce changes in host genes, some of which are detrimental (Zabala and Vodkin, 2007; Begin and Schoen, 2007; Beare et al., 2009). DNA methylation is especially important in plants, and mutants with reduced levels of cytosine methylation display highly abnormal developmental phenotypes (Finnegan et al., 1996; Kakutani et al., 1996; Ronemus et al., 1996). In conclusion, cassava *EnSpm*-like transposons are highly methylated, transcriptionally inactive and may not have been active during the recent history of cassava.

ACKNOWLEDGMENTS

M.A. Gbadegenin would like to acknowledge funding from the Commonwealth Scholarship Commission, UK. This publication is supported by University of Ibadan Senate Research Grant No. SRG/COM/2006/35A. It is also in part an output from a research project funded by the United Kingdom Department for International Development (DFID) for the benefit of developing countries: R8156 Crop Post-Harvest Programme. The views expressed are not necessarily those of DFID. This study has been carried out in compliance with the current laws governing genetic experimentation in the UK.

REFERENCES

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, et al. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410. Banks JA, Masson P and Fedoroff N (1988). Molecular mechanisms in the developmental regulation of the maize

Suppressor-mutator transposable element. *Genes Dev.* 2: 1364-1380.

Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, et al. (2009). Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus Coxiella. Infect. Immun. 77: 642-656.

Begin M and Schoen DJ (2007). Transposable elements, mutational correlations, and population divergence in *Caenorhabditis elegans. Evolution* 61: 1062-1070.

Chandler VL and Walbot V (1986). DNA modification of a maize transposable element correlates with loss of activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 1767-1771.

Chang S, Puryear J and Cairney J (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.

Chomet PS, Wessler S and Dellaporta SL (1987). Inactivation of the maize transposable element Activator (Ac) is associated with its DNA modification. *EMBO J.* 6: 295-302.

Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21. Fedoroff N, Schlappi M and Raina R (1995). Epigenetic regulation of the maize Spm transposon. *Bioessays* 17: 291-297.

©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)

Finnegan DJ (1992). Transposable elements. Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 861-867.

- Finnegan EJ, Peacock WJ and Dennis ES (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 8449-8454.
- Gbadegesin MA, Gómez-Vásquez R, Reilly K and Beeching JR (2007). Transcriptionally active mutator-like transposable elements in the genome of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Asian J. Plant Sci.* 6: 129-136.
- Grant SR, Gierl A and Saedler H (1990). En/Spm encoded tnpA protein requires a specific target sequence for suppression. *EMBO J.* 9: 2029-2035.
- Grant SR, Hardenack S, Trentmann S and Saedler H (1993). Functional cis-element sequence requirements for suppression of gene expression by the TNPA protein of the Zea mays transposon En/Spm. Mol. Gen. Genet. 241: 153-160.
- Han Y, Gómez-Vásquez R, Reilly K, Li H, et al. (2001). Hydroxyproline-rich glycoproteins expressed during stress responses in cassava. *Euphytica* 120: 59-70.
- Itoh Y, Hasebe M, Davies E, Takeda J, et al. (2003). Survival of Tdc transposable elements of the En/Spm superfamily in the carrot genome. *Mol. Genet. Genomics* 269: 49-59.
- Kakutani T, Jeddeloh JA, Flowers SK, Munakata K, et al. (1996). Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 12406-12411.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Lisch D, Carey CC, Dorweiler JE and Chandler VL (2002). A mutation that prevents paramutation in maize also reverses Mutator transposon methylation and silencing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99: 6130-6135.
- Luo D, Coen ES, Doyle S and Carpenter R (1991). Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus. Plant J.* 1: 59-69.
- McClintock B (1954). Mutations in maize and chromosomal aberrations in *Neurospora*. Carnegie Inst. Washington Yearbook 53: 254-261.
- Peterson PA (1953). A mutable pale green locus in maize. Genetics 38: 682-683.
- Ronemus MJ, Galbiati M, Ticknor C, Chen J, et al. (1996). Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis. Science* 273: 654-657.
- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, Motchoulskaia N, et al. (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768.
- Singer T, Yordan C and Martienssen RA (2001). Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene Decrease in DNA Methylation (DDM1). *Genes Dev.* 15: 591-602.
- Speulman E, Metz PL, van ArKel G, te Lintel HB, et al. (1999). A two-component enhancer-inhibitor transposon mutagenesis system for functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* 11: 1853-1866.
- Staginnus C, Huettel B, Desel C, Schmidt T, et al. (2001). A PCR-based assay to detect En/Spm-like transposon sequences in plants. *Chromosome Res.* 9: 591-605.
- Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H and Hirochika H (1998). Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon Tto1 by wounding and methyl jasmonate. *Plant Mol. Biol.* 36: 365-376.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, et al. (1999). Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell* 11: 1841-1852.
- Wisman E, Cardon GH, Fransz P and Saedler H (1998). The behaviour of the autonomous maize transposable element En/ Spm in Arabidopsis thaliana allows efficient mutagenesis. Plant Mol. Biol. 37: 989-999.
- Zabala G and Vodkin L (2007). Novel exon combinations generated by alternative splicing of gene fragments mobilized by a CACTA transposon in *Glycine max*. *BMC Plant Biol*. 7: 38.

Genetics and Molecular Research 9 (2): 639-650 (2010)