

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

O papel das mutações na compreensão da genética do milho

Sylvia Morais de Sousa
Cynthia Maria Borges Damasceno
Roberto Willians Noda

Sete Lagoas, MG
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição

1ª impressão (2010): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Sousa, Sylvia Morais de.

O papel das mutações na compreensão da genética do milho / Sylvia Morais de Sousa, Cynthia Maria Borges Damasceno, Roberto Willians Noda -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

33 p.: il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 100).

1. Milho. 2. *Zea mays*. 3. Genética vegetal. 4. Variação genética. I. Cynthia Maria Borges Damasceno. II. Roberto Willians Noda. III. Título. IV. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

Autores

Sylvia Moraes de Sousa

Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151.
35701-970 Sete Lagoas, MG.
smsousa@cnpmis.embrapa.br

Cynthia Maria Borges Damasceno

Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151.
35701-970 Sete Lagoas, MG.
cynthia@cnpmis.embrapa.br

Roberto Willians Noda

Biólogo, Ph.D., Pesquisador em Bioinformática da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151.
35701-970 Sete Lagoas, MG.
roberto.noda@cnpmis.embrapa.br

Sumário

1. Introdução	7
2. Transposons	8
3. Elementos ativadores Ac/Ds	11
4. Elementos mutadores	13
5. Elementos supressores-mutadores	16
6. Translocação do cromossomo B-A	17
7. Translocações com marcador recíproco wx-1	19
8. Mutações químicas	20
8.1. Mutagênese por EMS na prática	20
8.2. Taxas de mutação	23
8.3. Desenhando as triagens	23
8.4. Mapeando mutações induzidas quimicamente	24
9. Conclusão	26
10. Referências	27

O papel das mutações na compreensão da genética do milho

Sylvia Morais de Sousa

Cynthia Maria Borges Damasceno

Roberto Willians Noda

1.Introdução

O milho tem sido objeto de estudo genético desde que Gregor Mendel o usou para confirmar algumas de suas primeiras descobertas em ervilha. Desde então, o milho tem sido usado como um organismo modelo para uma série de estudos, que vão desde o desenvolvimento vegetal até a epigenética. Mutações identificadas na semente do milho forneceram importantes informações sobre a síntese de amido, a composição das proteínas de estoque e a biossíntese de carotenoides. Além disso, as antocianinas, que são expressas na semente, foram cruciais para a descoberta e a análise de elementos transponíveis. Mutantes meióticos são facilmente identificados e estudados em milho, não só por causa dos cromossomos grandes e distintos, mas também por ser possível obter uma série de estágios de desenvolvimento da meiose de uma única planta. Mutantes de milho têm sido usados para definir genes que são importantes no desenvolvimento da inflorescência e levaram à identificação de genes homólogos em outras culturas, como arroz. O milho também tem sido utilizado para os estudos de evolução e domesticação, uma vez que podem ser feitos cruzamentos entre milho e teosinte,

seu ancestral. Esses exemplos são apenas uma seleção das muitas possibilidades de triagem genética que têm sido e continuarão a ser usadas para a compreensão de genes para características importantes, como as de desenvolvimento, agronômicas e evolutivas.

Nós discutiremos neste artigo o uso da mutagênese insercional e de produtos químicos e como aproveitar a enorme diversidade natural que existe no milho. Alguns exemplos de triagem que exploram as características genéticas únicas do milho, como as que conferem cor à semente e às folhas, que são facilmente classificadas e quantificadas, serão apresentadas.

2. Transposons

Os transposons são partes do DNA que se movem, ou se transpõem de um sítio do genoma para outro. Estes elementos móveis de DNA carregam informações genéticas quando se movimentam, tendo assim uma grande importância para a organização do genoma. Elementos transponíveis de organismos tão diversos quanto *Drosophila*, levedura e milho apresentam uma conservação substancial quanto à sua organização e ao modo de transposição. Há dois tipos básicos de transposons: o primeiro tipo foi descrito por Barbara McClintock na década de 1940; os elementos dessa categoria codificam um ou dois genes necessários para o elemento transponível. Eles também contêm sequências repetidas invertidas de aproximadamente 10 pb que flanqueiam as sequências codificadoras. Estes elementos repetidos invertidos são reconhecidos pela transposase, uma enzima codificada por certos elementos transponíveis. Os transposons se ligam com essas sequências repetidas invertidas e integram os elementos transponíveis no sítio alvo. A segunda categoria consiste principalmente dos retrotransposons, que provavelmente têm origem viral. Eles se parecem com estruturas deixadas por tumores de vírus de RNA e fazem a transposição como um intermediário de RNA. Uma das proteínas codificadas pelo

retrotransposon é a transcriptase reversa, que é a enzima necessária para sintetizar o DNA tendo como molde RNA (BUCHANAN et al., 2000).

Barbara McClintock iniciou alguns experimentos para gerar deleções em alguns marcadores ao longo do cromossomo 9 de milho. Os genes que se localizavam próximos ao centrômero eram *C* (cor), *sh* (*shrunk*) e *wx* (endosperma *waxy*). Ela esperava que as deleções fossem abolir a atividade dos marcadores mais afastados do centrômero, ou seja, que a progênie perderia *C*, e as sementes ficariam descoloridas. Ela estava trabalhando com uma linhagem de milho cujo cromossomo tipicamente se quebrava entre *wx* e o centrômero, resultando na perda dos três marcadores ao mesmo tempo. Desconfiando de que havia algo mais frágil para que a quebra ocorresse nessa região McClintock designou um marcador, que chamou de *Ds* para dissociação. Observações posteriores mostraram que o *Ds* nesta posição não era estável, e que em algumas linhagens ele parecia pular do sítio entre *wx* e o centrômero para a posição entre o gene *C*, fazendo com que os grãos ficassem descoloridos. Em alguns raros casos, porém, o *Ds* pulava de volta durante o desenvolvimento da semente, assim sendo, as sementes ficavam descoloridas, porém com alguns pontos coloridos, tendo sua atividade gênica restaurada (Figura 1A). Por causa destas plantas instáveis, McClintock propôs que estas linhagens continham um ativador (*Ac*) e que tanto o *Ds* quanto o *Ac* eram necessários para que a transposição *Ds* acontecesse. Análises genéticas de McClintock (Figura 1B) e subsequentes estudos moleculares mostraram que o sistema de transposição *Ac/Ds* é uma complexa estrutura que consiste de dois tipos de elementos, o elemento autônomo (*Ac*) e o não autônomo (*Ds*). O primeiro codifica todos os produtos de que necessita para transpor e o segundo é uma família de elementos que são reconhecidos para transposases codificadas por *Ac* (BUCHANAN et al., 2000).

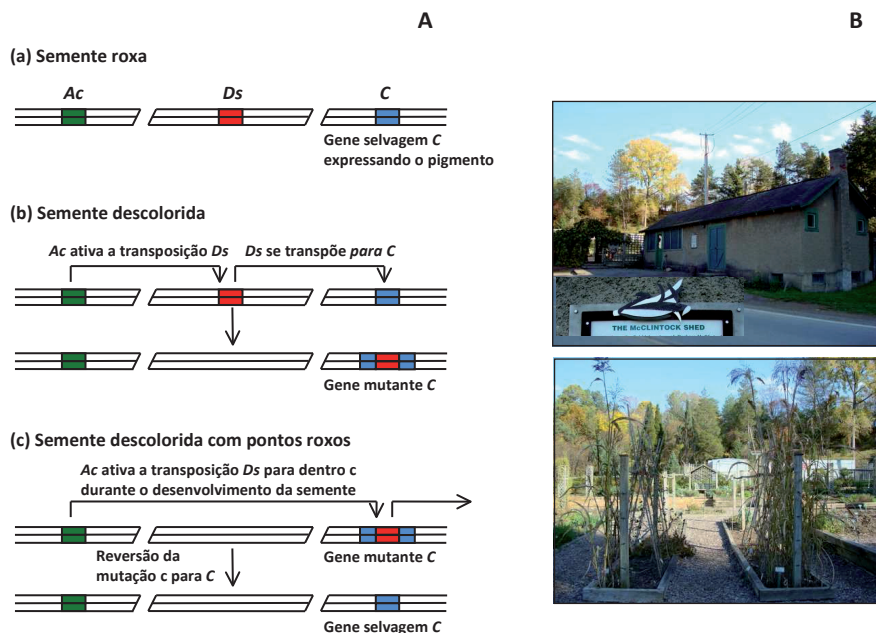


Figura 1. A: Efeitos da transposição dos padrões de cor em sementes de milho. Barbara McClintock foi a primeira cientista a reconhecer a possibilidade de elementos transponíveis. Ela propôs a teoria de que genes ou partes de genes poderiam “saltar” de uma posição no genoma para outra, baseada em suas observações da genética de fenótipos de sementes de determinadas plantas de milho. O exemplo a seguir ilustra a evolução dos acontecimentos: (A) O gene *C* codifica uma enzima que catalisa a formação de pigmentos de milho, por isso, quando *C* é ativo, a semente é roxa. (B) *Ac* codifica uma transposase que media a transposição do elemento *Ds*. *C* é desativado quando o elemento transponível *Ds* é inserido nele, resultando em um fenótipo de semente descolorida - *c*. (C) Se *Ds* é transposta (“pula”) fora do gene *c* durante o curso do desenvolvimento, *c* é restaurado para a atividade - *C*, e pontos roxos são visualizados na semente descolorida. Adaptado de Buchanan et al. (2000). **B:** Laboratório (acima) e área experimental (abaixo) na Cornell University – EUA, onde Barbara McClintock descobriu as evidências físicas que confirmaram a teoria que ligava a recombinação dos cromossomos com as mudanças genéticas.

3. Elementos ativadores *Ac/Ds*

Os elementos *Ac* e *Ds* tendem a transpor no local, por esta razão, eles podem ser efetivamente utilizados para saturar uma região cromossômica com inserções, proporcionando uma marca de clonagem molecular de genes próximos (VAN SCHAIK; BRINK, 1959; DOONER; BELACHEW, 1989; COWPERTHWAITTE et al., 2002). Estudos prévios demonstraram que o *Ac* e o *Ds* inserem, preferencialmente em genes, uma propriedade que é explorada para os tornar um recurso útil para genética reversa. Hoje, já estão disponíveis diversas estratégias para gerar uma série alélica para um determinado gene, incluindo as novas inserções atribuídas à transposição dos *Ac* ligados a partir de um locus (mutagênese regional) (BAI et al., 2007), para a excisão e reinserção em uma posição diferente no mesmo gene (mutagênese reconstitucional) (ALLEMAN; KERMICLE, 1993; ATHMA et al., 1992; MORENO et al., 1992), ou a excisão sem reinserção (*footprint* de alelos) (BAI et al., 2007). Alguns elementos *Ds* também causam quebras cromossômicas na presença de *Ac*, uma capacidade que tem sido explorada para análise mosaica. A análise mosaica aproveita as plantas geneticamente mosaicas para determinar se o produto do gene atua na célula de forma autônoma ou se células não mutantes são influenciadas por células adjacentes que carregam um alelo dominante mutante.

Brutnell e Conrad (2003) geraram uma coleção de linhagens com inserções *Ac* que são distribuídas aleatoriamente em todos os dez cromossomos de milho e têm suas sequências flanqueadoras disponíveis publicamente (KOLKMAN et al., 2005). Para selecionar para transposições de um sítio doador *Ac* para um sítio desvinculado, os autores se aproveitaram de duas propriedades: a capacidade de monitorar a atividade de *Ac* utilizando um *Ds* não autônomo inserido em um gene de cor de semente e a propriedade conhecida como

Ac de efeito de dosagem inversa (McCLINTOCK, 1951) - a excisão de um elemento *Ds* é atrasada conforme o número de elementos *Ac* aumenta, resultando em seções menores e de menor número. Em uma primeira etapa, sementes com uma maior dose de *Ac*, carregam novas inserções *Ac*, que podem ser identificadas com base na redução de pontos de frequência no repórter *Ds*. Aqueles em sítios desvinculados são selecionados com base na taxa de segregação da progênie do retrocruzamento com a linhagem repórter *Ds*. A linhagem de inserção *Ac* de Brutnell está disponível no “Maize Genetics Cooperation Stock Center” - MGCSC (<http://maizecoop.cropsci.uiuc.edu/>) e ainda pode ser estabilizada, fornecendo uma plataforma útil para regiões cromossômicas específicas (BRUTNELL; CONRAD, 2003).

Estratégias que utilizam o elemento *Ds* em um sistema de dois componentes oferecem algumas vantagens sobre o uso de *Ac* como elemento de inserção, incluindo a possibilidade de estabilizar as inserções por meio de cruzamento com uma fonte de transposase. Esta tarefa é mais facilmente realizada se utilizando o *Ac* imobilizado, um derivado do *Ac* que é incapaz de transpor, mas ainda funciona como uma fonte de transposase e está sujeita ao efeito de dose inversa (CONRAD; BRUTNELL, 2005). Em um esforço de colaboração, os laboratórios de Brutnell, Vollbrecht e Brendel geraram uma coleção de sequências indexadas de 10.000 inserções *Ds* independentes com o *background* W22. Quando inseridos em genes, estes elementos *Ds* representam uma fonte direta de alelos mutantes para estudos de genética reversa. No entanto, o verdadeiro poder deste sistema é a sua utilização para mutagênese regional. Os pesquisadores são capazes de selecionar um elemento *Ds*, que é fortemente ligado ao seu gene de interesse e o mobilizar novamente na presença de *Ac* ou *Ac*-imobilizado para saturar genes vizinhos com novas inserções. Sequências flanqueadoras *Ds*, protocolos e instruções sobre como obter as sementes correspondentes estão disponíveis no website “Plant

Genome Database (PlantGDB) *Ac/Ds* resources” (<http://www.plantgdb.org/>).

4. Elementos mutadores

O elemento autônomo *MuDr* regula a transposição de uma família de elementos não autônomos *Mu*. Estes elementos se distinguem pelas sequências conservadas únicas que são as repetições terminais invertidas (TIRs – *terminal inverted repeats*) de aproximadamente 210-bp (LISCH, 2002; WALBOT, 1992; BENNETZEN, 1996). Como *Ac*, os elementos *Mu* tendem a se inserir preferencialmente nos genes, ou perto deles (RAIZADA et al., 2001), mas ao contrário de *Ac*, se transpõem para sítios desvinculados (LISCH et al., 1995). Além disso, estão presentes no genoma do milho em maior número de cópias, o que os torna uma excelente ferramenta para triagem direcionada. No âmbito desta estratégia, novos alelos de um determinado gene são identificados na progênie F1 de cruzamentos envolvendo linhagens de *Mu* e um mutante conhecido. Na maioria das vezes, o objetivo é identificar outros alelos de um locus definido por alelos recessivos. Essa triagem não complementar identifica novos alelos com a taxa de mutação tão elevadas quanto 10^{-3} a 10^{-4} por loco, embora muitos dos alelos possam ser de diferentes tipos de lesões que não sejam simples inserções (BORTIRI et al., 2006a). Uma vez identificados, os novos mutantes podem ser cruzados com a linhagem *Mu* killer (*Muk*) para eliminar o efeito indesejável da elevada taxa de mutação que está associado com a atividade *Mutator*. A linhagem *Muk* é o resultado de uma duplicação invertida de um elemento *MuDR* parcialmente eliminado que leva à produção de pequenos RNAs de interferência e à metilação hereditária e silenciamento epigenético de elementos *MuDr* (SLOTKIN et al., 2003, 2005). PCR térmico assimétrico interlaçado (TAIL-PCR) e outras técnicas foram adaptadas para a identificação das sequências genômicas

flanqueadoras de inserções *Mu* (EDWARDS et al., 2002a; SETTLES et al., 2004; HANLEY et al., 2000).

Vários grupos têm aproveitado a elevada mutagenicidade do *Mu* para indução de mutação em alta escala. A “Rescue*Mu* collection of insertional mutants” foi gerada com o elemento *Mu1* transgênico (RAIZADA, et al., 2001; FERNANDES et al., 2004), o que facilitou o isolamento de sequências genômicas que flanqueiam os elementos transpostos Rescue*Mu*. Outra população, “Uniform*Mu* Maize Project”, deriva de uma linhagem ativa *Mu* que foi introgridida na linhagem W22 pura, providenciando alelos em um determinado *background*. As linhagens parentais da população Uniform*Mu* são mantidas por retrocruzamentos sucessivos com a W22 para manter constante o número de inserções a cada geração, o que indica que a perda de inserções devido à polinização cruzada é compensada por novas inserções germinais a cada geração (*steady-state Mutagenese*) (McCARTY et al., 2005). A cor bronze nas sementes de milho é usada como marcador para verificar se a transposição está ativada ou desativada (Figura 2). Sequências flanqueadoras foram isoladas para ambas as populações utilizando *Mu* TAIL-PCR e resgate plasmidial (McCARTY et al., 2005; SETTLES et al., 2007), e informações fenotípicas estão disponíveis em seus respectivos sites (<http://uniformmu.uf-genome.org/>).

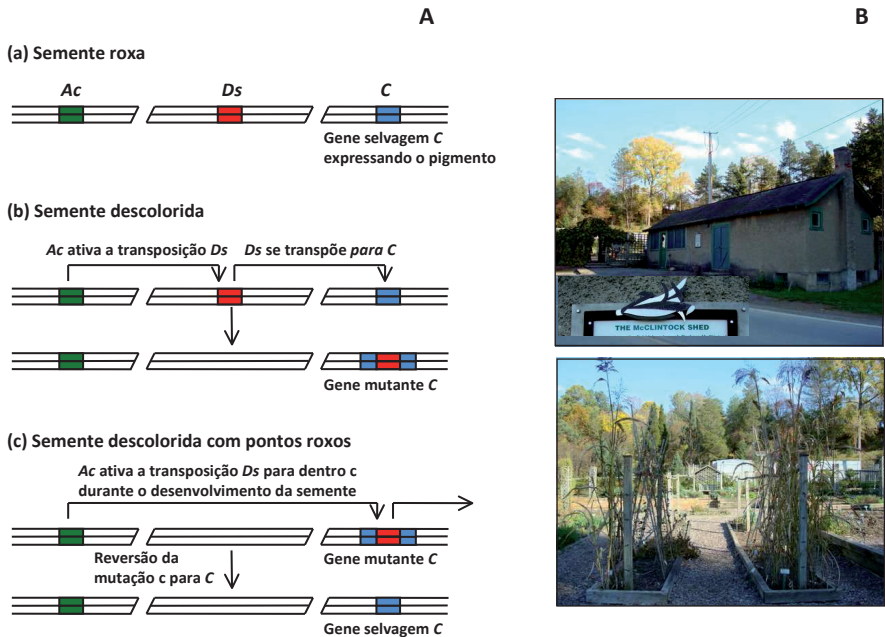


Figura 2. Exemplo de estabilidade do elemento *Mu* na coleção Uniform*Mu*. A semente de milho bronze é selvagem, a semente amarela está com o elemento *Mu* estável e a semente com pontos bronze está com o elemento *Mu* ativo, ou seja, ainda está mutagênica. Figura adaptada da imagem cedida por Karen E. Koch.

Outras populações de mutantes por inserção foram triadas eficientemente por PCR, numa base regular, através da combinação de *primers* que são concebidos para o TIRs *Mu* conservados em todos os elementos, e *primers* gene-específicos. Esses incluem “Maize Targeted Mutagenesis - MTM” (<http://mtm.cshl.edu/>) (MAY et al., 2003) e “Pioneer’s Trait Utility System for Corn - TUSC” (BENSEN et al., 1995). Para superar o problema das inserções somáticas, MTM inclui 43.776 famílias F2 que são derivadas de cruzamentos entre as linhagens ativas *Mu* e uma linhagem inibidora-*Mu*, similar a Muk. Triagens por PCR usando amostras combinadas de DNA da geração F1 da população MTM identificaram novas

inserções com uma taxa de mutação de $2 \text{ a } 4 \times 10^{-5}$ inserções por gene. Isto significa que inserções foram encontradas em cerca de metade dos genes estudados, um terço das quais foram transmitidas por meio da linhagem germinativa (MAY et al., 2003). Da mesma forma, a população TUSC inclui espigas derivadas de 42.000 plantas F1 e é rastreada por PCR (BENSEN et al., 1995). Populações semelhantes também foram geradas no Reino Unido (EDWARDS et al., 2002b) e na China (WENTING et al., 2006).

5. Elementos supressores-mutadores

O transposon autônomo *Spm*, também conhecido como Enhancer (*En*), foi descoberto independentemente por McClintock (McCLINTOCK, 1954) e por Peterson (PETERSON, 1953). Seleções não autônomas derivadas de *Spm* são chamadas defective *Spm* (*dSpm*) ou Inhibitor (*I*) e supressão de *Spm* derivados são chamados defeituosos *Spm* (*dSpm*) ou inibidor (*I*) e, quando inseridos nos genes ligados à cor, podem ser utilizados como repórteres para atividade de *Spm*. Assim, experimentos de *transposon tagging* utilizando *Spm* são conceitualmente semelhantes àqueles com *Ac* e *Ds*. Outra semelhança é que a transposição ocorre ligada a sítios e em taxas de mutação mais baixas do que os elementos *Mu* (GIERL; SAEDLER, 1989). *Spm* permitiu aos pesquisadores clonarem inúmeros genes de milho, incluindo o marcador de endosperma *opaco2* (SCHMIDT et al., 1987). Ao mobilizar um elemento *Spm* neste gene, Vollbrecht et al. (2005) relataram a codificação do gene ligado *ramosa1*, que é o gene necessário para o desenvolvimento das espiguetas em pares. A excisão de *Spm* de mutantes instáveis pode levar à reversão ou a novos alelos estabilizados que podem ajudar a identificar o gene correto. Alguns alelos estabilizados que carregam elementos *Spm* parcialmente inativos podem ser reconhecidos pelas mudanças na

frequência e no tempo de excisão (SCHIEFELBEIN et al., 1985).

6. Translocação do cromossomo B-A

As translocações B-A são trocas envolvendo o cromossomo supernumerário (B) e um membro dos cromossomos regulares do milho (A) (ROMAN 1947; ROMAN; ULLSTRUP, 1951). A propriedade única de não-disjunção do centrômero B é mantida nas translocações B-A. Durante a segunda divisão mitótica seguida da microesporogênese, o centrômero de B frequentemente leva à não disjunção, o que resulta em dois tipos de núcleos espermáticos, um com ausência do segmento translocado de A e o outro contendo duas cópias do segmento de A (Figura 3). Quando o pólen da planta heterozigota para a translocação B-A fertiliza um óvulo euplóide, quatro tipos de progênie (zigotos) são formados: um normal homozigoto, um heterozigoto com B-A translocado, um hipoplóide (uma dose do braço do cromossomo, cópia materna) e um hiperplóide (três doses do braço do cromossomo, um materno e dois paternos) (Figura 4). A frequência da não disjunção varia de acordo com cada translocação B-A, mas a maioria dos heterozigotos produz hipo e hiperplóides na frequência de 20-25% cada um (LEE; BECKETT, 1997).

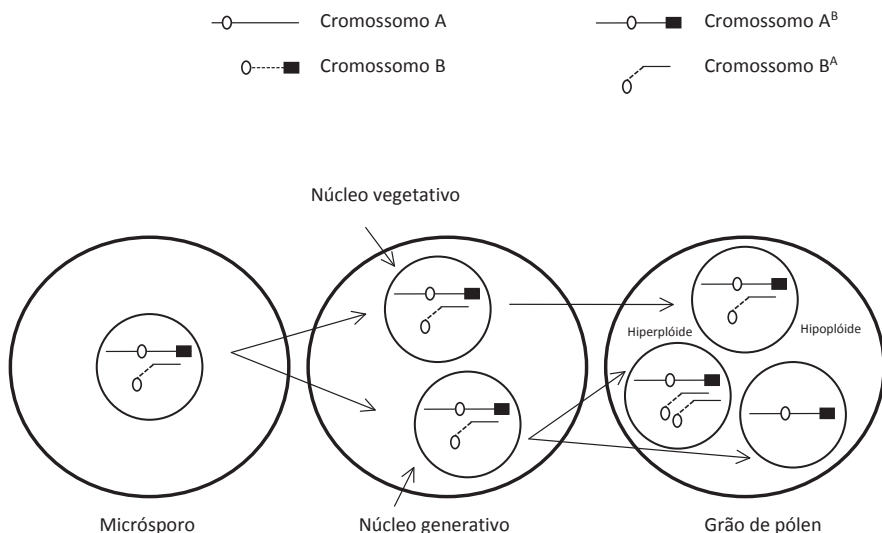


Figura 3. Divisões mitóticas do microsporo mostrando as translocações B-A sob não disjunção. Adaptado de Beckett (1978) e Neuffer et al. (1997).

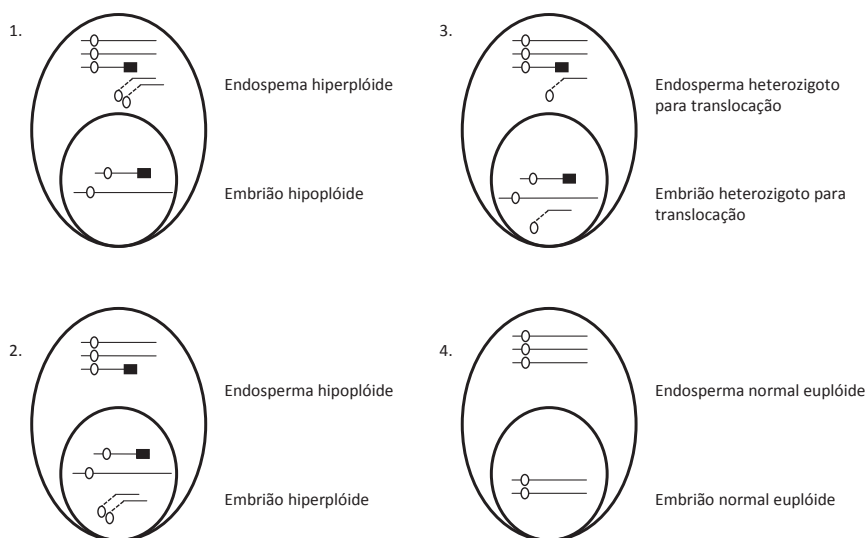


Figura 4. Possíveis constituições de embrião e endosperma para F1. Adaptado de Beckett (1978) e Neuffer et al. (1997).

Devido à propriedade única de não disjunção, as translocações B-A são um sistema eficiente para determinar na F1 em qual braço do cromossomo cada mutação recessiva está localizada. Quando a translocação B-A (por exemplo, o ponto de quebra está entre o mutante de interesse e o centrômero) é usada como macho, qualquer fêmea que apresente a semente ou planta recessiva irá ter F1 com indivíduos hipoplóides. Atualmente, existem 89 translocações B-A envolvendo 18 dos 20 braços cromossômicos. A expressão fenotípica dos indivíduos hipo e hiperplóides depende do segmento cromossômico envolvido, do *background* genético dos pais e da condição do ambiente (LEE; BECKETT, 1997).

7. Translocações com marcador recíproco wx-1

Além das translocações B-A, existe uma extensa coleção de translocações recíprocas disponíveis que usam o gene wx1 como marcador. Elas foram produzidas em julho de 1946 pelo teste da bomba atômica em Bikini e outros experimentos radioativos, e foram identificadas e analisadas por E.G. Anderson et al. (1949) e Longley (1961). Quando o F1 é obtido do cruzamento de uma linhagem normal, ele carrega um alelo Wx1 dominante com uma série de translocações com os marcadores wx1. Sendo que os heterozigotos produzidos podem ser retrocruzados com um estoque não mutante wx1. Esses heterozigotos irão produzir uma progênie que pode ser dividida em quatro classes com diferentes ligações no braço cromossômico onde o mutante está localizado, mas com uma variedade aleatória do mutante para todas as outras translocações (NEUFFER et al., 1997).

8. Mutações químicas

8.1. Mutagênese por EMS na prática

Uma das grandes vantagens de se trabalhar com genética de milho é que o cruzamento é um processo relativamente fácil, sendo necessário cobrir a espiga em desenvolvimento alguns dias antes dos tubos polínicos emergirem para evitar polinizações indesejadas. Um dia antes do cruzamento, a inflorescência masculina também é coberta com um saco, o que permite que o pólen fresco seja coletado imediatamente antes do cruzamento. O pólen permanece viável por algumas horas e pode ser usado para polinizar uma ou mais plantas ou ser tratado para mutagênese química. O único requerimento para mutagênese com elementos transponíveis é a seleção apropriada das linhagens parentais, que devem carregar pelo menos um elemento autônomo (totalmente capaz de se transpor). A habilidade de usar o pólen de uma planta com espiga de outra, faz com que triagens não complementares sejam possíveis na primeira geração. Triagem não complementar é a procura de mutantes, que é usada para identificar mutações recessivas adicionais a determinado gene. Em milho, as espigas de um mutante com uma perda de função conhecida são polinizadas com o pólen mutado e a sua F1 é triada para fenótipos mutantes. Com raras exceções (conhecidos como não alélicos, não complementares), estes fenótipos são esperados apenas quando ocorrem tanto na mutação nova quanto na conhecida, e que afetam o mesmo gene, isso significa que eles não se complementam. Recursos que permitem a compreensão da mutagênese por inserção são essenciais para análise comparativa funcional do genoma de plantas (CANDELA; HAKE, 2008).

A mutação química, por tratamento de pólen com etil metanosulfato (EMS) e os diferentes sistemas de transposon são ferramentas úteis para triagens diretas, sendo que a taxa de mutação por EMS

é pelo menos uma ordem de magnitude maior do que as mutações por transposons. EMS é particularmente útil para conduzir triagens mutagênicas em um *background* genético específico, por exemplo, para obter um alelo recessivo para uma mutação sabidamente dominante. Tradicionalmente os transposons são preferíveis para clonagem de genes devido à facilidade de isolá-los por metodologias moleculares para identificação da inserção. Transposons que se inserem com ligação próxima são particularmente úteis para obtenção de múltiplos alelos em um locus (CANDELA; HAKE, 2008).

Assim como em muitos outros modelos, a mutação química em milho é feita usando um agente alquilante (EMS), que produz predominantemente mutações pontuais. No milho, o pólen fresco é coletado e incubado com uma suspensão de EMS em óleo mineral e, posteriormente, aplicado em tubos polínicos não polinizados (NEUFFER, 1993). A mutação EMS de pólen (micrósporo após duas rodadas de mitose) é preferível à mutagênese de sementes, porque o alvo é uma única célula germinativa, garantindo assim que cada mutação seja um único evento (NEUFFER, 1982). Além disso, os pesquisadores podem usar o pólen mutado em cruzamentos controlados, como os exigidos para triagem não complementar. Por último, é possível obter uma estimativa a priori da eficiência da mutagênese através de ensaios de germinação *in vitro* do pólen mutado. Nesses ensaios, a viabilidade de um subconjunto de pólen mutado por EMS é monitorado, e as condições de mutagênese são ajustadas a fim de balancear a letalidade do pólen e a produção de sementes (CANDELA; HAKE, 2008).

Lesões induzidas por EMS (G-para-A) podem ocorrer em qualquer um dos dois núcleos do esperma do grão do pólen, mas apenas um dos núcleos do espermatozóide pode fertilizar o óvulo. Inversamente, lesões EMS no núcleo vegetativo ou no núcleo espermático que dão origem ao endosperma não são transmitidos para a próxima geração. Isso ocorre, porque nos alquilatos (EMS) apenas uma das

bases de um determinado par de bases, derivadas da mutagênese no pólen, pode aparecer como quimera na geração mutagênica M1, caso o zigoto se divida antes da lesão ser reparada (Figura 5). Quimeras M1, no entanto, são detectadas quando carregam alelos dominantes que provocam fenótipos visíveis, e quando a planta tem setores mutados. Embora indetectáveis, muitas plantas M1 também são quimeras de alelos recessivos e apresentam taxas de segregação distorcida na autopolinização das suas progênes M2 (CANDELA; HAKE, 2008).

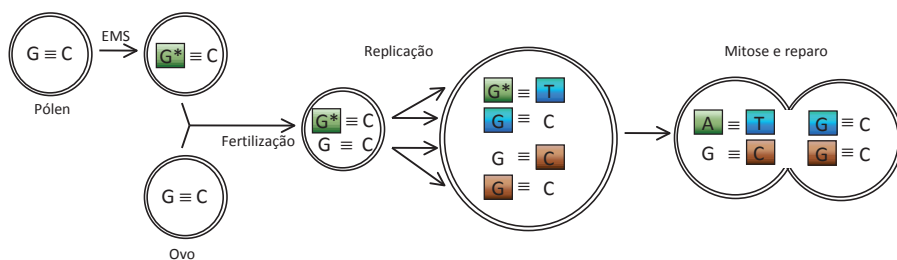


Figura 5. A origem de mosaicismos por reparo atrasado após mutagênese do pólen. A mutagênese por etil metanosulfanato (EMS) resulta na conversão de guanina (G) para O-6-etilguanina (G*), ou para timina (T) para O-4-etiltimina (não demonstrado). A fita de DNA replica após a fertilização e o G* se pareia com um T (analogamente, um T* faria par com um G). Após a mitose e o reparo, uma célula irá carregar o par de base com a modificação, enquanto a célula irmã não irá carregar. Se ocorrer uma divisão celular precoce no plano vertical e a mutação for dominante, a planta resultante será uma planta quimérica. Adaptado de Candela e Hake (2008).

8.2. Taxas de mutação

O pólen mutado de uma planta, a partir de uma linha pura, pode ser cruzado com outra da mesma linhagem para se obter mutantes com *background* uniforme. O pólen também pode ser usado para polinizar as espigas de uma planta que tem um *background* diferente, polimórfico, para facilitar o mapeamento diretamente na geração M2. Taxas de mutação tão elevadas quanto 10^{-3} alelos por gene têm sido reportadas (NEUFFER, 1993), sugerindo que alelos de um determinado gene podem ser encontrados por triagem de, no mínimo, 3.000 famílias M2, ou 3.000 plantas M1, no caso de uma triagem não complementar. Para uma triagem não complementar com plântulas com fenótipo visível, a polinização pode ser feita no campo e a triagem, em casa de vegetação, imediatamente após a colheita. Alelos dominantes visíveis aparecem na geração M1 em uma frequência relativa de um para cada 200 alelos recessivos. Metade desses dominantes visíveis são quimeras (CANDELA; HAKE, 2008). Mutantes induzidos por EMS com fenótipos visíveis em determinadas linhas puras estão listados no “Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB)” e podem ser obtidas através do “Maize Genetics Cooperation Stock Center (MGCSC)”, localizado na Universidade de Illinois, em Urbana-Champaign, EUA.

8.3. Desenhando as triagens

A técnica EMS tem sido particularmente útil em triagem supressora. A triagem supressora pode ser usada para encontrar genes que atuam numa via de interesse ou para identificar perda de função de alelos dos genes que foram inicialmente definidas por sua posição dominante de ganho de função. Por exemplo, a expressão ectópica do gene *knotted 1 (kn1)* (VOLLBRECHT et al., 1991) faz com que as células das folhas do mutante *Kn1-N* sejam anormais. Para identificar perda de função que inativam alelos do gene, espigas selvagens foram polinizadas com pólen de mutantes homozigotos

Kn1-N, resultando em plantas M1 que foram selecionadas para a ausência de fenótipo característico da folha de mutantes *Kn1-N* (KERSTETTER et al., 1997).

O projeto TILLING (segmentação induzida por lesões locais nos genomas) (<http://genome.purdue.edu/maizetilling>) de milho foi lançado como uma ferramenta para genética reversa de milho utilizando a mutagênese EMS nas populações com *background* W22 e B73 (TILL et al., 2004; WEIL; MONDE, 2007). Para identificar as substituições nos pares de base, o gene de interesse é primeiramente amplificado a partir de uma combinação de amostras de DNA genômico de plantas M1 ou M2 plantas. O DNA é, então, aquecido e reanelado, para favorecer a formação de DNA heteroduplex entre as fitas complementares normal e mutante. Quando as substituições estão presentes nos fragmentos amplificados, a CEL I endonuclease irá reconhecer a inadequação na heteroduplex, criando ligações nas moléculas de DNA. As fitas de DNA são então separadas e resolvidas em géis de eletroforese de alta resolução. Detecções de pequenos fragmentos revelam a existência de uma mutação e, em última instância, leva à identificação de um portador da mutação na amostragem da população. Atualmente, essas populações têm rendimento 1-2 alelos em uma triagem de 1.000 plantas M1, mas novas populações com maiores densidades estão sendo desenvolvidas (WEIL; MONDE, 2007). Como o milho sofreu uma duplicação em todo o genoma, este e outros recursos baseados em transposons para genética reversa serão ferramentas essenciais para identificar alelos mutantes em genes que têm funcionamento redundante duplicado (RHOADES, 1951).

8.4. Mapeando mutações induzidas quimicamente

Até recentemente, a principal limitação da mutagênese EMS foi a dificuldade em clonagem de genes baseada apenas no mapa

posicional. A sequência do genoma do arroz e do sorgo tem servido como modelo de organização da sequência dos genes a serem clonados em milho e de outras gramíneas (BORTIRI et al., 2006b). O gene “required to maintain repression 1” (*rmr1*) exemplifica como a disponibilidade da sequência de arroz tem acelerado a clonagem de genes de milho definidos por mutações induzidas por EMS. Um caso típico de clonagem posicional começa com a genotipagem de plantas individuais, a partir de um mapeamento da população ligada utilizando marcadores moleculares baseados em PCR, tais como os definidos por simples sequência repetida (SSR) e inserção-deleção (InDel) de polimorfismos. Mapas de sequência, posições e informações sobre milhares de tais marcadores estão disponíveis nos websites do “MaizeGDB” (<http://maizegdb.org>) e “Maize Genetic Mapping Project” (<http://maize-mapping.plantgenomics.iastate.edu>). Depois de definir um intervalo para o candidato *rmr1* no cromossomo 6 do milho utilizando marcadores SSR, os autores utilizaram sintenia com uma região do cromossomo 5 do arroz para selecionar genes candidatos e para desenhar novos marcadores. O fato de terem sido encontradas diferentes mutações G-para-A em vários mutantes, independentemente de *rmr1*, permitiu a identificação molecular do gene. No entanto, genes para as quais não há ortólogo em arroz (VOLLBRECHT et al., 2005) não podem se beneficiar desta abordagem e devem se basear em mutagenese insercional ou no próprio genoma do milho.

Apesar dos esforços para manipular elementos transponíveis para facilitar a recuperação de sequências flanqueadoras genômicas, transposons endógenos altamente mutagênicos ainda são mais eficientes do que os transposons engenheirados. Estratégias de mapeamento estão aproveitando as novas tecnologias de sequenciamento em alta escala para determinar a inserção de sítios de elementos endógenos em linhagens *Mu* altamente mutagênicas. Juntamente com a sequência do genoma, estas novas coleções de sequências-indexadas de mutantes por inserção estão acelerando

o nosso conhecimento sobre a função e a regulação dos genes nas gramíneas.

9. Conclusão

Apesar de importantes ferramentas do milho, como elementos transponíveis, terem contribuído para o desenvolvimento de outras plantas como organismos-modelo, muitas das mutações que foram isoladas ao longo da história da pesquisa do milho, ainda não foram clonadas. Os fenótipos desses mutantes surgiram a partir de lesões em genes que estão envolvidos nos mais diversos processos. Mutantes adicionais induzidos em diferentes *backgrounds* irão ajudar a compreender mais a fundo a biologia das plantas, em especial os processos específicos das gramíneas. O gene responsável pela mutação é comprovado de maneira mais fácil quando ocorre a identificação de lesões em vários alelos independentes, que são obtidos de maneira direta (triagens não complementares) e reversa (triagem de PCR das coleções de mutantes por inserção). A reversão de alelos mutáveis, como as induzidas por *Ac* e *Spm*, oferecem um outro meio de confirmação do gene que provoca a mutação. Atualmente, com o genoma sequenciado, os cientistas podem mapear e identificar, através da biologia molecular, os genes responsáveis pelo QTL, que geralmente têm uma importância agrônômica. O sequenciamento do genoma também está ajudando a superar os obstáculos da genética reversa. As ferramentas de estudos do milho devem chegar até onde estão as facilidades para os estudos da *Arabidopsis thaliana* (planta modelo), cujos mutantes por inserção estão indexados e estão disponíveis para quase todos os genes. Recursos similares estão sendo desenvolvidos para o milho e serão ferramentas essenciais para a compreensão da função dos genes em milho e em outras gramíneas.

10. Referências

ALLEMAN, M.; KERMICLE, J. L. Somatic variegation and germinal mutability reflect the position of transposable element dissociation within the maize R gene. **Genetics**, Austin, v. 135, p. 189-203, 1993.

ATHMA, P.; GROTEWOLD, E.; PETERSON, T. Insertional mutagenesis of the maize P gene by intragenic transposition of Ac. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 199-209, 1992.

ANDERSON, E. G.; LONGLEY, A. E.; LI, C. H.; RETHERFORD, K. I. Hereditary effects produced in maize by radiation from the Bikini atomic bomb. I. Studies on seedlings and pollen of the exposed generations. **Genetics**, Austin, v. 34, p. 639-646, 1949.

BAI, L.; SINGH, M.; PITT, L.; SWEENEY, M.; BRUTNELL, T. P. Generating novel allelic variation through *Activator* insertional mutagenesis in maize. **Genetics**, Austin, v. 175, p. 981-992, 2007.

BAKER, B.; COUPLAND, G.; FEDOROFF, N.; STARLINGER, P.; SCHELL, J. Phenotypic assay for excision of the maize controlling element Ac in tobacco. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 1547-1554, 1987.

BECKETT, J. B. B-A translocations in maize: I. Use in locating genes by chromosome arms. **Journal of Heredity**, Washington, v. 69, p. 27-36, 1978.

BENNETZEN, J. L. The Mutator transposable element system of maize. **Current topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 204, p. 195-229, 1996.

BENSEN, R. J.; JOHAL, G. S.; CRANE, V. C.; TOSSBERG, J. T.; SCHNABLE, P. S.; MEELEY, R. B.; BRIGGS, S. P. Cloning and characterization of the maize An1 gene. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 75-84, 1995.

BORTIRI, E.; CHUCKA, G.; VOLLBRECHTB, E.; ROCHEFORDC, T.; MARTIENSSSEND, R.; HAKEA, S. Ramosa2 encodes a lateral organ boundary domain protein that determines the fate of stem cells in branch meristems of maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 574-585, 2006a.

BORTIRI, E.; JACKSON, D.; HAKE, S. Advances in maize genomics: the emergence of positional cloning. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 164-171, 2006b.

BRUTNELL, T. P.; CONRAD, L. J. Transposon tagging using *Activator* (Ac) in maize. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 236, p. 157-176, 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CANDELA, H.; HAKE, S. The art and design of genetic screens: maize. **Nature**, London, v. 9, p. 192-203, 2008.

COWPERTHWAIT, M.; PARKA, W.; XU, Z.; YAN, X.; MAURISA, S. C.; DOONER, H. K. Use of the transposon Ac as a gene-searching engine in the maize genome. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 713-726, 2002.

CARDON, G. H.; FREY, M.; SAEDLER, H.; GIERL, A. Mobility of the maize transposable element *En1/Spm* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 773-784, 1993.

CONRAD, L. J.; BRUTNELL, T. P. *Ac-immobilized*, a stable source of *Activator* transposase that mediates sporophytic and gametophytic excision of *Dissociation* elements in maize. **Genetics**, Austin, v. 171, p. 1999-2012, 2005.

DOONER, H. K.; BELACHEW, A. Transposition pattern of the maize element Ac from the Bz-M2(Ac) allele. **Genetics**, Austin, v. 122, p. 447-457, 1989.

EDWARDS, D.; COGHILL, J.; BATLEY, J.; HOLDSWORTH, M.; EDWARDS, K. J. Amplification and detection of transposon insertion flanking sequences using fluorescent *Mu* AFLP. **Biotechniques**, Notick, v. 32, p. 1090-1097, 2002a.

EDWARDS, D.; STEVENSON, D.; FORSYTH, A.; HEGARTY, M.; BATLEY, J.; HOLDSWORTH, M.; EDWARDS, K. J. Identification of transposon-tagged maize genes displaying homology to arrayed cDNA clones with the use of *Mutator* insertion display. **Genome Letters**, v. 1, n. 1, p. 48-55, 2002b.

FEDOROFF, N.; WESSLER, S.; SHURE, M. Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*. **Cell**, Cambridge, v. 35, p. 235-242, 1983.

FERNANDES, J.; DONG, Q.; SCHNEIDER, B.; MORROW, D. J.; NAN, G. L.; BRENDEN, V.; WALBOT, V. Genome-wide mutagenesis of *Zea mays* L. using *RescueMu* transposons. **Genome Biology**, v. 5, p. R82, 2004.

HANLEY, S.; EDWARD, D.; STEVENSON, D.; HAINES, S.; HEGARTY, M.; SCHUCH, W.; EDWARDS, K. J. Identification of transposon-tagged genes by the random sequencing of *Mutator*-tagged DNA fragments from *Zea mays*. **Plant Journal for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, p. 557-566, 2000.

KERSTETTER, R. A.; LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D.; MITH, L. G.; HAKE, S. Loss of function mutations in the maize homeobox gene, *knotted1*, are defective in shoot meristem maintenance. **Development**, Cambridge, v. 124, p. 3045-3054, 1997.

KOLKMAN, J. M.; CONRAD, L. J.; FARMER, P. R.; HARDEMAN, K.; AHERN, K. R.; LEWIS, P. E.; SAWERS, R. J. H.; LEBEJKO, S.; CHOMET, P.; BRUTNELL, T. P. Distribution of activator (*Ac*) throughout the maize genome for use in regional mutagenesis. **Genetics**, Austin, v. 169, p. 981-995, 2005.

LEE, E. A.; BECKETT, J. B. Unique cytogenetic tools. In: NEUFFER, M. G.; COE, E. H.; WESSLER, S. R. **Mutants of maize**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

LISCH, D. Mutator transposons. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 7, p. 498-504, 2002.

LISCH, D.; CHOMET, P.; FREELING, M. Genetic characterization of the *Mutator* system in maize: behavior and regulation of *Mu* transposons in a minimal line. **Genetics**, Austin, v. 139, p. 1777-1796, 1995.

LONGLEY, A. E. **Breakage points for four corn translocation series and other corn chromosome aberrations**. Pasadena: California Institute of Technology, 1961. (USDA-ARS Crop Research Bulletin, 34-16).

MAY, B. P.; LIU, H.; VOLLBRECHT, E.; SENIOR, L.; RABINOWICZ, P. D.; ROH, D.; PAN, X.; STEIN, L.; FREELING, M.; ALEXANDER, D.; MARTIENSSEN, R. Maize-targeted mutagenesis: a knockout resource for maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 11541-11546, 2003.

McCARTY, D. R.; SETTLES, A. M.; SUZUKI, M.; TAN, B. C.; LATSHAW, S.; PORCH, T.; ROBIN, K.; BAIER, J.; AVIGNE, W.; LAI, J.; MESSING, J.; KOCH, K. E.; HANNAH, L. C. Steady-state transposon mutagenesis in inbred maize. **Plant Journal for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 44, p. 52-61, 2005.

McCLINTOCK, B. Chromosome organization and gene expression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 16, p. 13-47, 1951.

McCLINTOCK, B. Mutations in maize and chromosomal observations in *Neurospora*. **Yearbook of the Carnegie Institution of Washington**, v. 53, p. 254-260, 1954.

MORENO, M. A.; CHEN, J.; GREENBLATT, I.; DELLAPORTA, S. L. Reconstitucional mutagenesis of the maize P gene by short-range *Ac* transpositions. **Genetics**, Austin, v. 131, p. 939-956, 1992.

NEUEFFER, M. G. Mutagenesis. In: FREELING, M.; WALBOT, V. (Ed.). **Maize handbook**. New York: Springer, 1993. p. 212-219.

NEUEFFER, G. M.; COE, E. H.; WESLER, S. R. **Mutants of maize**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1997.

NEUEFFER, M. G. Mutant induction in maize. In: SHERIDAN, W. F. (Ed.). **Maize for biological research**. Charlottesville, VA: Plant Molecular Biology Association, 1982. p. 61-64.

PETERSON, P. A. A mutable pale green locus in maize. **Genetics**, Austin, v. 38, p. 682-683, 1953.

GIERL, A.; SAEDLER, H. The *En/Spm* transposable element of *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 13, p. 261-266, 1989.

RAIZADA, M. N.; NAN, G. L.; WALBOT, V. Somatic and germinal mobility of the RescueMu transposon in transgenic maize. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1587-1608, 2001.

RHOADES, M. M.; Duplicate genes in maize. **American Naturalist**, Chicago, v. 85, p. 105-110, 1951.

ROMAN, H. Mitotic nondisjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in maize. **Genetics**, Austin, v. 32, p. 391-409, 1947.

ROMAN, H.; ULLSTRUP, A. J. The use of A-B- translocations to locate genes in maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 43, p. 450-454, 1951.

SCHMIDT, R. J.; BURR, F. A.; BURR, B. Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque2*. **Science**, Washington, v. 238, p. 960-963, 1987.

SCHIEFELBEIN, J. W.; RABOY, V.; FEDOROFF, N. V.; NELSON, O. E. J. Deletions within a defective *suppressor-mutator* element in maize affect the frequency and developmental timing of its excision from the *bronze* locus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, p. 4783-4787, 1985.

SETTLES, A. M.; LATSHAW, S.; McCARTY, D. R. Molecular analysis of high-copy insertion sites in maize. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, n. 6, p. 54, 2004.

SETTLES, A. M.; HOLDING, D. R.; TAN, B. C.; LATSHAW, S. P.; LIU, J.; SUZUKI, M.; LI, L.; O'BRIEN, B. A.; FAJARDO, D. S.; WROCLAWSKA, E.; TSEUNG, C.-W.; LAI, J.; HUNTER, C. T.; AVIGNE, W. T.; BAIER, J.; MESSING, J.; HANNAH, C.; KOCH, K. E.; BECRAFT, P. W.; LARKINS, B. A.; McCARTY, D. R. Sequence-indexed mutations in maize using the *UniformMu* transposon-tagging population. **BMC Genomics**, v. 8, p. 116, 2007.

SLOTKIN, R. K.; FREELING, M.; LISCH, D. *Mu killer* causes the heritable inactivation of the *Mutator* family of transposable elements in *Zea mays*. **Genetics**, Austin, v. 165, p. 781-797, 2003.

SLOTKIN, R. K.; FREELING, M.; LISCH, D. Heritable transposon silencing initiated by a naturally occurring transposon inverted duplication. **Nature Genetics**, New York, v. 37, p. 641-644, 2005.

VAN SCHAIK, N. W.; BRINK, R. A. Transpositions of modulator, a component of the variegated *pericarp* allele in maize. **Genetics**, Austin, v. 44, p. 725-738, 1959.

VOLLBRECHT, E.; VEIT, B.; SINHA, N.; HAKE, S. The developmental gene *knotted1* is a member of a maize homeobox gene family. **Nature**, Washington, v. 350, p. 241-243, 1991.

VOLLBRECHT, E.; SPRINGER, P. S.; GOH, L.; BUCKLER, E. S. T.; MARTIENSSSEN, R. Architecture of floral branch systems in maize

and related grasses. **Nature**, Washington, v. 436, p. 1119-1126, 2005.

TILL, B. J.; REYNOLDS, S. H.; WEIL, C.; SPRINGER, N.; BURTNER, C.; YOUNG, K.; BOWERS, E.; CODOMO, C. A.; ENNS, L. C.; DDEN, A. R.; GREENE, E. A.; COMAI, L.; HENIKOFF, S. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 12, 2004.

WALBOT, V. Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 49-82, 1992.

WEIL, C. F.; MONDE, R. A. Getting the point: mutations in maize. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. S60-S67, 2007.

WENTING, L.; YOUJUN, G.; FENG, T.; QING, S.; YONGLIAN, Z. Construction and genetic analysis of *Mutator* insertion mutant population in maize. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, p. 2604-2610, 2006.