



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0616375-0 A2**

(22) Data de Depósito: 20/09/2006
(43) Data da Publicação: 21/06/2011
(RPI 2111)



(51) *Int.Cl.:*
A01H 1/08 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UMA PLANTA DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE, DE SEMENTE DUPLO-HAPLÓIDE, DE UM SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES DUPLO-HAPLÓIDES, DE UM SET DE GRÃOS DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE EM UMA ESPIGA DE MILHO, DE UM EMBRIÃO DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES DUPLO-HAPLÓIDES**

(57) Resumo: MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UMA PLANTA DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE, DE SEMENTE DUPLO-HAPLÓIDE, DE UM SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES DUPLO-HAPLÓIDES, DE UM SET DE GRÃOS DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE EM UMA ESPIGA DE MILHO, DE UM EMBRIÃO DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE E SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES DUPLO-HAPLÓIDES. São fornecidos métodos para produzir plantas, sementes, e células vegetais de milho duplo-haplóide (*Zea mays*).

(30) Prioridade Unionista: 21/09/2005 US 60/718,989

(73) Titular(es): E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY,
PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

(72) Inventor(es): JOANNE E. BARTON, MARK E. WILLIAMS,
SHEILA E. MADDOCK, TANVEER HUSSAIN, WILLIAM J. GORDON-
KAMM, XINLI E. WU, ZUO-YU ZHAO

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT US2006036426 de 20/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/038075 de 05/04/2007

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UMA PLANTA DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE,
DE SEMENTE DUPLO-HAPLÓIDE, DE UM SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES
DUPLO-HAPLÓIDES, DE UM SET DE GRÃOS DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE
EM UMA ESPIGA DE MILHO, DE UM EMBRIÃO DE MILHO DUPLO-
5 HAPLÓIDE E SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES DUPLO-HAPLÓIDES

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de melhoramento
vegetal e de produção de plantas duplo-haplóides.

10

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Plantas homozigotas são básicas para desenvolvimento de
produtos e comercialização de plantas. Obter plantas
15 homozigotas requer diversas gerações de auto-polinização e
análise de segregação. Isso é uma utilização ineficiente de
trabalho e tempo. Seria útil, portanto, desenvolver um
método para reduzir as etapas de polinização manual
normalmente necessárias para se obter uma planta homozigota
20 e reduzir a quantidade de tempo necessária para obter uma
população de plantas homozigotas. Um meio de obter plantas
homozigotas sem a necessidade de autopolinizar múltiplas
gerações é produzir haplóides e, então, duplicar os
cromossomos para formar duplo-haplóides.

25

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Métodos para produzir plantas, sementes, e células
vegetais duplo-haplóides são providos. Os métodos

apresentados aumentam a eficiência do processo de duplo-haploidia aumentando o número de duplo-haplóides obtidos e diminuindo a quantidade de tempo requerida para produzir os duplo-haplóides.

5

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Uma planta haplóide possui um único grupo (genoma) de cromossomos e o número reduzido de cromossomos (n) na planta haplóide é igual àquele do gameta.

Uma planta diplóide possui dois grupos (genomas) de cromossomos e o número de cromossomos ($2n$) é igual àquele do zigoto.

15

Um duplo-haplóide, ou planta duplo-haplóide, ou célula, é aquele que é desenvolvido pela duplicação de um grupo haplóide de cromossomos. Uma planta ou semente que é obtida a partir de uma planta duplo-haplóide que é auto-polinizada por qualquer número de gerações pode ser ainda identificada como uma planta duplo-haplóide. Uma planta duplo-haplóide é considerada uma planta homozigota. Uma planta é considerada como duplo-haplóide se ela é fértil, mesmo que toda a parte vegetativa da planta não consista das células com o grupo duplicado de cromossomos. Por exemplo, uma planta será considerada uma planta duplo-haplóide se contiver gametas viáveis, mesmo se for quimérica.

Um "embrião haplóide imaturo" é definido como o embrião formado após um núcleo de esperma de um grão de pólen se

30

fundir com os núcleos polares no saco embrionário para criar um endosperma triplóide (3N) e antes de secar.

A "embrião duplo-haplóide" é um embrião que possui uma
5 ou mais células que contém 2 grupos de cromossomos homozigotos.

"Calo" refere-se a uma massa de células ou tecidos diferenciada em proliferação.

10

Os termos "promover o contato", "entra em contato com" ou "colocado em contato com" pode ser usado para significar "contato direto" ou "contato indireto". Por exemplo, o meio compreendendo um agente de duplicação pode ter contato
15 direto com a célula haplóide, ou o meio compreendendo o agente de duplicação pode ser separado da célula haplóide por filtro de papel, tecidos vegetais, ou outras células, assim o agente de duplicação é transferido através do filtro de papel ou células para a célula haplóide.

20

O termo "meio" inclui compostos em estado líquido, gasoso ou sólido.

Como aqui usado, o termo "planta" inclui referência a
25 plantas inteiras, órgãos vegetais (e.g., folhas, caules, raízes, etc.), sementes e células vegetais e progênie da mesma. "Célula vegetal", como aqui usado inclui, sem limitação, sementes, culturas em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes,
30 brotos, gametófitos, esporófitos, pólen, e microesporos. A

classe de plantas que pode ser usada nos métodos providos incluem ambas plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Providos estão métodos para 1) identificar embriões
5 haplóides em um estágio inicial com alta precisão, 2) protocolos de duplicação de cromossomos em um estágio inicial de desenvolvimento do embrião, 3) geração de planta a partir de embriões de estágio inicial. Os métodos são, geralmente, independentes de genótipo, estendendo, assim, o
10 escopo de plantas que podem ser usadas para produzir duplo-haplóides. Os métodos geralmente produzem uma alta frequência de plantas duplo-haplóides que são férteis.

Um método provido compreende obter um embrião duplo-
15 haplóide, semente, ou planta promovendo o contato de um embrião haplóide com um agente de duplicação, obtendo um embrião duplo-haplóide, semente, ou planta.

Outro método provido é obter uma planta duplo-haplóide
20 compreendendo as seguintes etapas: a) polinizar óvulos, ou estigmas, de uma planta com pólen de uma linha indutora, caracterizado pelo fato de que a linha indutora possui um gene marcador que é expressado em embriões e/ou tecido de endosperma; b) selecionar um embrião haplóide que não
25 expressa um gene marcador; c) promover o contato do embrião haplóide com um gás, solução ou sólido compreendendo um agente de duplicação; e d) regenerar aquele embrião em uma planta duplo-haplóide.

Outro método é obter uma semente duplo-haplóide compreendendo as seguintes etapas: a) obter uma semente haplóide polinizando um óvulo com uma linha indutora, caracterizado pelo fato de que o óvulo compreende um grupo
5 de cromossomos maternos, caracterizado pelo fato de que a linha indutora compreende um grupo de cromossomos paternos; b) promover o contato da semente haplóide com um meio compreendendo um agente de duplicação; c) selecionar uma semente duplo-haplóide, caracterizado pelo fato de que a
10 semente duplo-haplóide compreende um endosperma triplóide em um embrião duplo-haplóide. A semente duplo-haplóide produzida por um método pode ser produzida, caracterizada pelo fato de que o endosperma triplóide compreende dois grupos de cromossomos maternos e um grupo de cromossomos
15 paternos, e caracterizado pelo fato de que o embrião duplo-haplóide possui um primeiro e um Segundo grupo de cromossomos maternos, e caracterizado pelo fato de que o primeiro grupo de cromossomos maternos é homozigoto ao segundo grupo de cromossomos maternos. Também incluído está
20 um método de determinar a origem dos cromossomos com o uso de um marcador que é expressado durante o desenvolvimento inicial da semente.

Provido está um método de obter uma população de
25 plantas de milho duplo-haplóides compreendendo as seguintes etapas: a) obter um grupo de sementes haplóides polinizando uma espiga com uma linha indutora caracterizado pelo fato de que a espiga compreende um grupo de cromossomos maternos e caracterizado pelo fato de que a linha indutora compreende
30 um grupo de cromossomos paternos; b) promover o contato de

dito grupo de sementes haplóides com um meio compreendendo um agente de duplicação; c) eleger um grupo de sementes duplo-haplóides, caracterizado pelo fato de que cada semente de dito grupo de sementes duplo-haplóides compreende um endosperma triplóide e um embrião duplo-haplóide; d) cultivar dito grupo de sementes duplo-haplóides em uma população de plantas de milho duplo-haplóides. O grupo de sementes duplo-haplóides produzido possui endosperma triplóide e o endosperma triplóide compreende dois grupos de cromossomos maternos e um grupo de cromossomos paternos. O embrião duplo-haplóide também possui dois grupos de cromossomos maternos. Esses dois grupos de cromossomos são homozigotos. O primeiro grupo de cromossomos é replicado para formar o segundo grupo de cromossomos. Os vários grupos obtidos a partir desses métodos podem incluir o grupo de embriões em uma espiga de milho, o grupo de sementes em uma espiga de milho, e o grupo de plantas de milho duplo-haplóides.

Outro aspecto do método é obter uma planta de milho duplo-haplóide compreendendo: a) polinizar estilos-estigmas de uma espiga de milho com uma linha indutora; b) promover o contato da espiga de milho com um meio compreendendo um agente de duplicação; c) gerar um embrião a partir da espiga de milho em uma planta de milho duplo-haplóide. Outros aspectos do método incluem remover a espiga de milho da planta com ou sem o talo ou alguma porção do talo anexado. A espiga pode ser removida antes, durante, ou após a polinização e colocadas em uma solução. A espiga pode ser colocada em uma solução de 6 horas a 21 dias após a

polinização e até 35 dias após a polinização. A solução pode compreender água ou água e nutrientes. A solução pode vir ao contato com a espiga diretamente ou indiretamente, por exemplo via filtro de papel ou algodão. O agente de
5 duplicação pode vir ao contato com a espiga após a polinização e antes ou depois da espiga ser removida da planta. O agente de duplicação cromossômico podem vir ao contato com a espiga diretamente ou indiretamente, por exemplo, via filtro de papel ou algodão.

10

Outro método provido é obter um grupo de embriões de milho duplo-haplóides compreendendo as seguintes etapas: a) obter um grupo de embriões haplóides polinizando uma espiga com uma linha indutora; caracterizado pelo fato de que a
15 espiga compreende um grupo de cromossomos maternos de uma planta de milho F1; e caracterizado pelo fato de que a linha indutora compreende um grupo de cromossomos paternos; b) promover o contato de dito grupo de embriões haplóides com um meio compreendendo um agente de duplicação; c) selecionar
20 um grupo de embriões de milho duplo-haplóides caracterizado pelo fato de que cada embrião de milho duplo-haplóide de dito grupo de embriões de milho duplo-haplóides é geneticamente diferente de cada dos outros embriões de milho duplo-haplóides de dito grupo de embriões de milho duplo-
25 haplóides; d) cultivar dito grupo de embriões de milho duplo-haplóides em uma população de plantas de milho duplo-haplóides. Esse método desenvolve um único grupo de embriões de milho duplo-haplóides. Esse grupo único de embriões é derivado diretamente de uma espiga de milho,
30 caracterizado pelo fato de que "ser derivado diretamente"

indica que uma geração filha não ocorre entre o desenvolvimento dos embriões haplóides e ou desenvolvimento do grupo de embriões duplo-haplóides.

5 Um método de seleção intercruzada é provido compreendendo as seguintes etapas: a) polinização cruzada de duas plantas de milho intercruzadas; b) cultivar a semente F1; c) polinizar a planta F1 com uma linha indutora para produzir embriões haplóides; d) promover o contato dos
10 embriões haplóides com um agente de duplicação cromossômico para produzir embriões duplo-haplóides;

e) gerar plantas duplo-haplóides; f) avaliar ditas plantas duplo-haplóides para desempenho agrícola e habilidade
15 combinada. O desenvolvimento de etapa de haplóides pode ser feito em gerações mais tardias, F2, F3, F4, etc. Produzir haplóides a partir de gerações mais tardias permite oportunidades adicionais para recombinação.

20 Os métodos providos podem incluir o uso de recuperação de embrião. A recuperação de embrião é efetuado promovendo o contato de um embrião com um meio contendo nutrientes e gerando uma planta. Fito-hormônios podem ou não estar incluídos no meio de recuperação de embrião.

25

Outro método de obter um embrião transgênico duplo-haplóide pode compreender isolar um embrião haplóide, transformar o embrião haplóide, colocar o embrião haplóide em um meio compreendendo um agente de duplicação

cromossômico, e selecionar um embrião transgênico duplo-haplóide.

Em qualquer desses métodos, marcadores podem ser usados nesse processo de distinguir os embriões haplóides dos embriões obtidos a partir de polinização normal (2N).

Em qualquer desses métodos, os cromossomos podem ser duplicados no estágio de embrião imaturo, no estágio de semente madura, ou em qualquer momento entre a polinização da planta e antes da germinação da semente haplóide.

Em qualquer desses métodos, o embrião haplóide que passa por duplicação cromossômica pode ser isolado, pode estar na semente ou grão, pode estar na espiga em uma fatia de sabugo, pode estar na espiga ou espigão, ou o embrião haplóide pode estar no grão que está na espiga e em uma planta. O agente de duplicação pode alcançar o embrião haplóide enquanto a espiga está na planta e a planta está intacta. Por exemplo, o agente de duplicação pode ser levado ao contato diretamente ou indiretamente com o embrião haplóide. Em alguns casos, o agente de duplicação pode ser transportado pela planta. A planta pode ser cultivada hidroponicamente e o agente de duplicação pode ser absorvido através das raízes da planta e transportado para o embrião haplóide. A planta pode começar for a sendo cultivada em solo ou um meio de crescimento e, então, transferido para uma solução hidropônica onde o agente de duplicação pode ser adicionado. Em outro aspecto do método, a planta pode ser cultivada em solo ou um meio de crescimento e, então, o

agente de duplicação é adicionado ao solo ou meio de crescimento, de forma que possa ser transportado para o embrião haplóide.

5 Métodos para obter plantas homozigotas, células vegetais, e sementes são providos. Também providos estão métodos para obter embriões haplóides e sementes e métodos para aumentar a duplicação de cromossomos. Os métodos compreendem promover o contato de células haplóides com um
10 agente de duplicação cromossômico. Os métodos também compreendem cruzar uma planta selecionada e uma linha indutora para produzir embriões haplóides ou sementes. Outros métodos compreendem cruzar uma planta selecionada e uma linha indutora para produzir uma célula haplóide, e
15 tratar a célula haplóide com um agente de duplicação cromossômico. Os métodos provêm células vegetais duplo-haplóides que podem ser geradas em uma planta contendo genes homozigotos.

20 Os métodos evitam métodos de autopolinização e cruzamento dispendiosos de tempo para obter um traço homozigoto de interesse ou uma planta essencialmente homozigota. Os métodos apresentados podem ser usados para produzir populações duplo-haplóides que não contêm a
25 heterozigosidade residual de intercruzados obtidos através do método tradicional de auto polinização. Os métodos podem ser úteis para genômica funcional, tais como análise de *knock-out*, análise funcional de genes recessivos, substituição de genes, recombinação homóloga, direcionamento
30 de genes, estacamento de transgene, e análise de avaliação

letal versus não letal de genes. Com os sistemas diplóides previamente conhecidos, essas análises são muito complicadas e caras.

5 Sistemas de indução de haplóides foram desenvolvidos para várias plantas para produzir tecidos, plantas e sementes haplóides. O sistema de indução haplóide pode produzir plantas haplóides de qualquer genótipo cruzando uma linha selecionada (como fêmea) com uma linha indutora. Tais
10 linhas indutoras para milho incluem Stock 6 (Coe, 1959, Am. Nat. 93:381-382; Sharkar and Coe, 1966, Genetics 54:453-464) RWS (Roeber and Geiger 2001, submitted to Crop Science), KEMS (Deimling, Roeber, and Geiger, 1997, Vortr. Pflanzenzuchtg 38:203-224), ou KMS e ZMS (Chalyk, Bylich &
15 Chebotar, 1994, MNL 68:47; Chalyk & Chebotar, 2000, Plant Breeding 119:363-364), e mutação de gametófito indeterminado (ig) (Kermicle 1969 Science 166:1422-1424). As revelações das quais são aqui incorporadas por referência.

20 Amplos cruzamentos de hibridização podem ser também usados para produzir haplóides. Esse método é, às vezes, referido como o método de *bulbosum* (Kasha and Kao, 1970, Nature 225:874-876). Esse método de produção de haplóides ocorre devido à eliminação dos cromossomos do parental
25 polinizador.

Métodos para obter plantas haplóides são também descritos em Kobayashi, M. et al., J. of Heredity 71(1):9-14, 1980, Pollacsek, M., Agronomie (Paris) 12(3):247-251,
30 1992; Cho-Un-Haing et al., J. of Plant Biol., 1996,

39(3):185-188; Verdoodt, L., et al., Feb. 1998, 96(2):294-300; Genetic Manipulation in Plant Breeding, Proceedings International Symposium Organized by EUCARPIA, Sept. 8-13, 1985, Berlin, Germany; Chalyk et al., 1994, Maize Genet Coop. Newsletter 68:47; Chalyk, S. T., 1999, Maize Genet. Coop. Newsletter 73:53-54; Coe, R.H., 1959, *Am. Nat.* 93:381-382; Deimling, S. et al., 1997, *Vortr. Pflanzenzuchtg* 38:203-204; Kato, A., 1999, *J. Hered.* 90:276-280; Lashermes, P. et al., 1988, *Theor. Appl. Genet.* 76:570-572 e 76:405-410; Tyrnov, V.S. et al., 1984, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 276:735-738; Zabirowa, E.R. et al., 1996, *Kukuruza I Sorgo* N4, 17-19; Aman, M.A., 1978, *Indian J. Genet Plant Breed* 38:452-457; Chalyk S.T., 1994, *Euphytica* 79:13-18; Chase, S.S., 1952, *Agron. J.* 44:263-267; Coe, E.H., 1959, *Am. Nat.* 93:381-382; Coe, E.H., and Sarkar, K.R., 1964 *J. Hered.* 55:231-233; Greenblatt, I.M. and Bock, M., 1967, *J. Hered.* 58:9-13; Kato, A., 1990, *Maize Genet. Coop. Newsletter* 65:109-110; Kato, A., 1997, *Sex. Plant Reprod.* 10:96-100; Nanda, D.K. and Chase, S.S., 1966, *Crop Sci.* 6:213-215; Sarkar, K.R. and Coe, E.H., 1966, *Genetics* 54:453-464; Sarkar, K.R. and Coe, E.H., 1971, *Crop Sci.* 11:543-544; Sarkar, K.R. and Sachan J.K.S., 1972, *Indian J. Agric. Sci.* 42:781-786; Kermicle J.L., 1969, Mehta Yeshwant, M. R., *Genetics and Molecular Biology*, September 2000, 23(3):617-622; Tahir, M.S. et al. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, August 2000, 43(4):258-261; Knox, R.E. et al. *Plant Breeding*, August 2000, 119(4):289-298; e US 5.639.951, as revelações das quais são aqui incorporadas por referência.

Quando uma linha indutora é usada para polinizar uma planta diplóide, embriões haplóides são derivados. Um núcleo de esperma do pólen se funde com os núcleos polares no saco embrionário para criar um endosperma triplóide (3N).

5 O endosperma triplóide conterá 2 grupos de cromossomos da fêmea e 1 grupo de cromossomos do macho, o que, nesse caso, é a linha indutora. O embrião haplóide contém um único grupo de cromossomos, que são derivados da planta fêmea.

10 Células haplóides, embriões haplóides, sementes haplóides, plântulas haplóides ou plantas haplóides podem ser tratadas com um agente de duplicação cromossômico. Plantas homozigotas podem ser regeneradas a partir de células haplóides promovendo o contato das células

15 haplóides, tais como células de embrião haplóide, com agentes de duplicação cromossômicos. As células haplóides podem vir ao contato com o agente de duplicação no momento da polinização, em qualquer hora após a polinização, tipicamente de 6 horas a 21 dias após a polinização, de 6

20 horas a 15 dias após a polinização, no estágio de semente madura, no estágio de plântula, ou no estágio de planta. O embrião haplóide pode vir ao contato com o agente de duplicação quando um núcleo de esperma de um grão de pólen se funde com os núcleos polares no saco embrionário para

25 criar um endosperma triplóide (3N) (quando o embrião haplóide é formado), a qualquer hora após a polinização, tipicamente de 6 horas a 21 dias após a polinização, de 6 horas a 15 dias após a polinização, ou no estágio de semente madura. O embrião haplóide pode ser isolado. Isso pode

30 estar contido no grão, óvulo ou semente. Isso pode estar

também na espiga, no caso de milho, ou no espigão, no caso de outros grãos, tais como trigo. E espiga compreendendo o embrião haplóide pode estar na planta ou isolada da planta. A espiga pode ser também seccionada. Após a duplicação cromossômica, o embrião duplo-haplóide conterá 2 cópias de cromossomos derivados maternalmente. A eficiência do processo para obter plantas duplo-haplóides a partir de embriões haplóides pode ser maior do que 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90%.

10

Métodos de duplicação de cromossomos são descritos em Antoine-Michard, S. et al., Plant cell, tissue organ cult., Cordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1997, 48(3):203-207; Kato, A., Maize Genetics Cooperation Newsletter 1997, 36-37; e Wan, Y. et al., TAG, 1989, 77: 889-892. Wan, Y. et al., TAG, 1991, 81: 205-211. As revelações das quais são aqui incorporadas por referência. Métodos típicos envolvem promover o contato das células com colchicina, agentes anti-microtúbulos ou herbicidas anti-microtúbulos, pronamida, óxido nitroso, ou qualquer inibidor mitótico para células homozigotas duplo-haplóides. A quantidade de colchicina usada no meio é geralmente 0,01% - 0,2% ou aproximadamente 0,05% ou APM (5 - 225 μ M). A quantidade de colchicinas pode variar de aproximadamente 400-600mg/L ou aproximadamente 500mg/L. A quantidade de pronamida no meio é de aproximadamente 0,5 - 20 μ M. Exemplos de inibidores mitóticos conhecidos estão incluídos na Tabela 1. Outros agentes podem ser usados com os inibidores mitóticos para melhorar a eficiência de duplicação. Tais

agentes podem ser dimetil sulfóxido (DMSO), adjuvantes, surfactantes, e similares.

TABELA 1

5

Nome comum / nome comercial	CAS	IUPAC
Colchicina e Derivados de Colchicina		
colchicina / Ácido acetiltrimetilco l-quinínico		(S)-N-(5,6,7,9- tetrahidro-1,2,3,10- tetrametoxi- 9-oxobenzo (a) heptaleno-7-il) acetamida
Derivados de colchicina		
Carbamatos		
Carbetamida	(R)-1- (etilcarbamoil)etil carbanilato	(2R)-N-etil-2- [[(fenilamino) carbonil] o xi]pro-panamida
cloroprofam		
profam		
Benzamidas		
Pronamida / propizamida	3,5-dicloro-N-(1,1- dimetilpropinil)ben -zamida	3,5-dicloro-N-(1,1- dimetil-2- propinil)benzamida
tebutam		
Ácidos Benzoicos		
Clortal dimetil (DCPA),		

Dicamba / dianat/ disugran (dicamba-metil) (BANVEL, CLARITY)	Ácido 3,6-dicloro- o-anísico	Ácido 3,6-dicloro-2- metoxibenzóico
Agentes de duplicação cromossômicos de Dinitroanilina		
benfluralina / benefina / (BALAN)	N-butil-N-etil- α,α,α -trifluoro- 2,6-dinitro-p- toluidina	N-butil-N-etil-2,6- dinitro-4- (trifluorometil)benzenam ina
Butralina	(RS)-N-sec-butil-4- tert-butil-2,6- dinitroanilina	4-(1,1-dimetiletil)-N- (1-metilpropil)-2,6- dinitrobenzenamina
Cloralina		
Dinitramina	N1,N1-dietil-2,6- dinitro-4- trifluorometil-m- fenilenodiamina	N3,N3-dietil-2,4- dinitro-6- (trifluorometil)-1,3- benzenodiamina
etalfluralina (Sonalan)	N-etil- α,α,α - trifluoro-N-(2- metilalil)-2,6- dinitro-p-toluidina	N-etil-N-(2-metil-2- propenil)-2,6-dinitro-4- (trifluorometil)benzenam ina

Flucloralina	N-(2-cloroetil)- 2,6-dinitro-N- propil-4- (trifluorometil)ani lina ou N-(2-cloroetil)- α,α,α -trifluoro- 2,6-dinitro-N- propil-p-toluidina	N-(2-cloroetil)-2,6- dinitro-N-propil-4- (trifluorometil)benzenam ina
Isopropalina	4-isopropil-2,6- dinitro-N,N- dipropilanilina	4-(1-metiletil)-2,6- dinitro-N,N- dipropilbenzenamina
metalpropalina	α,α,α -trifluoro-N- (2-metilallil)-2,6- dinitro-N-propil-p- toluidina	N-(2-metil-2-propenil)- 2,6-dinitro-N-propil-4- (trifluorometil)benzenam ina
nitralina	4-metilsulfonil- 2,6-dinitro-N,N- dipropilanilina	4-(metilsulfonil)-2,6- dinitro-N,N- dipropilbenzenamina
orizalina (SURFLAN)	3,5-dinitro-N ₄ ,N ₄ - dipropilsulfanilami da	4-(dipropilamino)-3,5- dinitrobenzenosulfonamid a
pendimetalina (PROWL)	N-(1-etilpropil)- 2,6-dinitro-3,4- xilidina	N-(1-etilpropil)-3,4- dimetil-2,6- dinitrobenzenamina

Prodiamina	5-dipropilamino- α,α,α -trifluoro- 4,6-dinitro-o- toluidina ou 2,6-dinitro-N1,N1- dipropil-4- trifluorometil-m- fenilenodiamina	2,4-dinitro-N3,N3- dipropil-6- (trifluorometil)-1,3- benzenodiamina
Profluralina	N-ciclopropilmetil- α,α,α -trifluoro- 2,6-dinitro-N- propil-p-toluidina ou N-ciclopropilmetil- 2,6-dinitro-N- propil-4- trifluorometilanili na	N-(ciclopropilmetil)- 2,6-dinitro-N-propil-4- (trifluorometil)benzenam ina
trifluralina (TREFLAN, TRIFIC, TRILLIN)	α,α,α -trifluoro- 2,6-dinitro-N,N- dipropil-p- toluidina	2,6-dinitro-N,N- dipropil-4- (trifluorometil)benzenam ina
Fosforoamidatos		
AMP (Amiprofos metil); amiprofos-metil		

Butamifos	O-etil O-6-nitro-m- tolil (RS)-sec- butilfosforamidotio ato	O-etil O-(5-metil-2- nitrofenil) (1- metilpropil)fosforamidot ioato
Piridinas		
Ditiopir		
Tiazopir	metil 2- difluorometil-5- (4,5-dihydro-1,3- tiazol-2-il)-4- isobutil-6- trifluorometilnicot inato	metil 2-(difluorometil)- 5-(4,5-dihydro-2- tiazolil)-4-(2- metilpropil)-6- (trifluorometil)-3- piridinecarboxilato

O agente de duplicação cromossômico pode vir em contacto com o embrião em vários momentos. Se o embrião é isolado, o agente de duplicação pode vir em contato imediatamente após o isolamento e antes da germinação. Se o
5 embrião está contido na semente, ele pode vir ao contato com o agente de duplicação em qualquer hora após a polinização e antes de secar. O embrião, tanto isolado como não, pode vir ao contato com o agente de duplicação a qualquer momento
10 entre 6 horas após a polinização e 21 dias após a polinização. A duração de contato entre o agente de duplicação cromossômico pode variar. O contato pode ser de menos de 24 horas, por exemplo 4-12 horas, a cerca de uma semana. A duração de contato é geralmente de cerca de 24
15 horas a 2 dias.

Métodos providos podem ou não passar pelo estágio de formação de calo. Os embriões haplóides podem ser colocados em um "meio não promotor de calo". O termo "meio não promotor de calo" refere-se a um meio que não suporta
5 proliferação de massas diferenciadas de células ou tecido. Um "meio não promotor de calo" preferencial é usado para recuperação de embrião, contendo típicas formulações de sais e vitaminas bem conhecidas na arte. Tais meios de recuperação de embrião, ou de cultura de embrião, contêm
10 pouca ou nenhuma auxina [para revisão, veja Raghaven, V., 1966. Biol. Rev. 41:1-58]. O meio de amadurecimento de embrião também representa outro "meio não promotor de calo" preferencial. Meio de amadurecimento de embrião é usado para promover o desenvolvimento de embriões cultivados *in*
15 *vitro*, prevenindo germinação precoce, e tipicamente contém formulações de sais/vitaminas padrão (dependendo da espécie), níveis de açúcar aumentados e/ou ácido absísico exogenamente adicionado, com pouca ou nenhuma auxina. Outro tipo de meio é usado para cultivo de brotos, ou proliferação
20 de brotos múltiplos. Esse meio de brotos múltiplos pode, novamente, conter pouca ou reduzida auxina, mas, ao invés, contém níveis elevados de citoquinina que promovem proliferação e crescimento de meristemas.

25 Uma auxina é definida como um hormônio vegetal endógeno, tal como ácido índole acético (IAA), derivados de IAA, tais como ácido índole-3-butérico, assim como compostos com atividade tipo auxina, tais como 2,4-D, picloram, dicamba, 3,4-D, 2,4,5-T e ácido acético naftaleno (NAA).

Uma citoquinina é definida como hormônio vegetal naturalmente ocorrente, tais como 2-isopentinel adenina (2iP), zeatina e hididrozeatina, ou um composto sintético com atividade tipo citoquinina, tais como quinetina e BAP
5 (beinzilaminopurina).

Polinucleotídeos ou polipeptídeos envolvidos no estímulo de crescimento ou estímulo de ciclo celular podem ser usados para aumentar a frequência de embriões haplóides produzidos por espiga, aumentar a recuperação de plantas haplóides, e/ou estimular a eficiência de duplicação de cromossomos. O polinucleotídeo estímulo de crescimento pode ser provido tanto pela fêmea como pelo macho parental. O polinucleotídeo ou polipeptídeo de estímulo de crescimento
15 pode ser provido por transformação estável ou transiente. Polinucleotídeos cuja sobre-expressão foi mostrada por estimular o ciclo celular incluem Ciclina A, Ciclina B, Ciclina C, Ciclina D, Ciclina E, Ciclina F, Ciclina G, e Ciclina H; Pin1; E2F; Cdc25; RepA e polinucleotídeos
20 vegetais virais similares codificando proteínas associadas com a replicação. Ver U.S. Patent Publication No. 2002/0188965.

Após a duplicação bem-sucedida de cromossomos haplóides, pode ser desejável para remover os polinucleotídeos de estímulo de crescimento. Isso pode ser conseguido usando vários métodos de excisão gênica, tais como o uso de sítios de recombinação e recombinases.
25

Um gene marcador de pontuação pode ser usado nos métodos, por exemplo, marcadores coloridos no endosperma ou embrião podem ser utilizados. Tais marcadores incluem GUS (US 5.599.670 e US 5.432.081), GFP (US 6.146.826; US 5.491.084; e WO 97/41228), luciferase (US 5.674.713 e Ow et al. 1986 Science 234 (4778) 856-859), YFP, CFP, CRC (Ludwig et al., 1990), proteínas de recifes de coral ou genes de antocianina, tais como alelos A, C, R-nj, R1-scm, R1-mb(aleurona perolada), R1-r:standard, R1-Randolph, R1-ch:Stadler, R1-d:Catspaw, R1-d:Arapaho, R1-nj, R1-nj:Cudu, R1-nj:Chase, R1-scm2, R1-sc:124, R1-sup-R1-suppressible, R1-K10-II; R1 r1-X1, R1-ch, R1-g, R1-lsk, R1-r, R1-sc122, R1-sc*5691, R1-sc:m122, R1-sc:m2, R1-scm:3, R1-sk:nc-2, R1-sk, R1-st, etc., e outros conhecidos na arte. As revelações das
 10 quais são aqui incorporadas por referência.
 15

Para que um marcador de antocianina funcione em milho, vários alelos têm de ser levados em consideração. A produção de pigmentos de antocianina em tecidos de milho inclui os
 20 produtos de ambos genes estruturais e reguladores. Genes estruturais, tais como A1, A2, Bz1, Bz2 e C1, codificam as enzimas biossintéticas da via metabólica. Os genes reguladores de antocianina caem em duas classes de fatores de transcrição, C1/P11 e R1/B1, os quais interagem para
 25 ativar a transcrição dos genes estruturais.

Mais especificamente, a expressão de antocianina no grão requer um alelo determinador de coloração no locus C1, tal como C1 ou C1-S. C1-S é dominante ao alelo (C1) de tipo
 30 selvagem e apresenta pigmentação intensificada (Cone, KC, et

al. 1986. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:9631-9635.; Scheffler, B., et al. 1994. Molecular analysis of *C1* alleles in *Zea mays* defined regions involved in the expression of this regulatory gene. Mol. Gen. Genet. 242:40-48). A expressão de *C1*, ao contrário, é dependente do gene *Vp1*; *Vp1* codifica um fator de transcrição que está envolvido na expressão de genes durante a germinação de semente. A especificidade de grão de expressão de *C1* resulta, porque a expressão de *Vp1* é limitada ao endosperma (aleurona) e embrião (Hattori T, et al. 1992. The *Viviparous-1* gene and abscisic acid activate the *C1* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. Genes & Dev. 6:609-618).

Além disso, a expressão de antocianina no grão de milho (endosperma e/ou embrião) requer certos alelos *R1/B1*. Para ser útil no rastreamento haplóide/diplóide, um alelo deve conferir coloração em ambos endosperma (aleurona) e embrião. (Coe et al. 1988, The genetics of corn. pp. 81-258. In: Sprague GF, Dudley JW (eds) Corn and Corn Improvement, 3rd ed. Amer. Soc. Agronomy, Madison.) listaram três tipos de alelos que conferem coloração em ambos aleurona e escutelo (embrião): *R-nj*, *R-scm* e *B-peru*.

Rnj é o alelo mais comumente usado para rastreamento haplóide/diplóide de sementes maduras (Nanda and Chase, 1966. An embryo marker for detecting monoplastoids of maize (*Zea mays* L). Crop Sci. 6:213-215; Greenblatt and Bock, 1967. A commercially desirable procedure for detection of

monoploids in maize. J. Hered. 58:9-13). Como foi mencionado em relação a C1, níveis de expressão de R-nj foram mostrados por estarem correlacionados com parâmetros de maturação de grão (Alexander and Cross, 1983. Grain fill characteristics of early maize (Zea mays) strains selected for variable R-nj expression. Euphytica 32:839-844.). Mais recentemente, R-scm2 foi também usado (Kato A. 2002. Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage. Plant breeding 121:370-377; e Kato A. 2003. Chromosome doubling method. U.S. Patent Application 20030005479).

Algumas linhas indutoras também contêm um marcador de coloração. Por várias razões pode ser desejável expressar o gene marcador no embrião. Em particular, pode ser desejável expressar o gene marcador no estágio inicial de desenvolvimento, cerca de 10 horas - 15 dias após a polinização. Se o marcador é um transgene, usar um promotor apropriado, tal como um promotor de oleosina ou Lec1 pode ser benéfico. Embriões haplóides podem, então, ser distintos de embriões normalmente polinizados, pois os embriões haplóides não contêm o gene marcador.

Marcadores selecionáveis, pontuáveis, negativos, positivos podem ser usados nos métodos. Marcadores podem vir através da planta feminina ou masculina. O método preferível é ter os marcadores virem através da planta masculina.

Células haplóides de embriões, sementes, plantas, etc. podem ser identificadas por diversos métodos, tais como, por contagem de cromossomos, medição do comprimento de células guardas, ou pelo uso de um Citômetro de Fluxo.

5

Marcadores moleculares PCR quantitativo podem ser usados para determinar se um tecido ou planta é feito de células duplo-haplóides ou é feito de células diplóides (células obtidas através de polinização normal).

10

Transformação do embrião haplóide pode ser usada nos métodos. O tipo de transformação não é crítico para os métodos; vários métodos de transformação estão atualmente disponíveis. Como métodos mais novos estão disponíveis para transformar células hospedeiras, eles podem ser diretamente aplicados. Conseqüentemente, uma ampla variedade de métodos foi desenvolvida para inserir uma seqüência de DNA no genoma de uma célula hospedeira para obter a transcrição e/ou tradução da seqüência. Assim, qualquer método que provenha transformação/transfecção eficiente pode ser empregado.

20

Métodos para transformar várias células hospedeiras são descritas em Klein et al. "Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment", Bio/Technol. New York, N.Y., Nature Publishing Company, March 1992, 10(3):286-291. Técnicas para transformar uma ampla variedade de espécies de plantas superiores são bem conhecidas e descritas na literatura técnica, científica, e de patentes. Ver, por exemplo, Weising et al., Ann. Rev. Genet. 22:421-477 (1988).

30

Por exemplo, o construto de DNA pode ser introduzido diretamente no DNA genômico de célula vegetal usando técnicas, tais com eletroporação, transfecção induzida por PEG, bombardeamento de partículas, distribuição de fibra de silicone, ou microinjeção de protoplastos de célula vegetal ou calo embriogênico. Ver, e.g., Tomes et al., Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. pp.197-213 in Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods. eds. O. L. Gamborg and G.C. Phillips. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1995. A introdução de construtos de DNA usando precipitação de polietileno glicol é descrita em Paszkowski et al., Embo J. 3:2717-2722 (1984). Técnicas de eletroporação são descritas em Fromm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82:5824 (1985). Técnicas balísticas de transformação são descritas em Klein et al., Nature 327:70-73 (1987).

Alternativamente, os construtos de DNA podem ser combinados com regiões flanqueado T-DNA e introduzidos em um vetor hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens*. As funções de virulência de *Agrobacterium tumefaciens* hospedeiro irão direcionar a inserção do construto e marcador adjacente no DNA de célula vegetal quando a célula é infectada pela bactéria. Técnicas de transformação mediadas por *Agrobacterium tumefaciens* são bem descritas na literatura científica. Ver, por exemplo Horsch et al., Science 233:496-498 (1984), e Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80:4803 (1983). Por exemplo, transformação de milho por *Agrobacterium* é descrita em U.S. Patent No. 5.981.840.

Transformação de monocotiledôneas por *Agrobacterium* é encontrada na U.S. Patent No. 5.591.616. Transformação de feijões de soja por *Agrobacterium* é descrita em U.S. Patent No. 5.563.055.

5

Outros métodos de transformação incluem (1) transformação induzida por *Agrobacterium rhizogenes* (ver, e.g., Lichtenstein and Fuller In: Genetic Engineering, vol. 6, PWJ Rigby, Ed., London, Academic Press, 1987; e 10 Lichtenstein, C. P., and Draper, J., In: DNA Cloning, Vol. II, D. M. Glover, Ed., Oxford, IRI Press, 1985), Application PCT/US87/02512 (WO 88/02405 publicada em 7 de abril de 1988) descreve o uso de linhagem A4 de *A. rhizogenes* e seu plasmídeo Ri junto com os vetores pARC8 ou pARC16 de *A.* 15 *tumefaciens* (2) absorção de DNA induzida por lipossomo (ver, e.g., Freeman et al., Plant Cell Physiol. 25:1353, 1984), (3) o método de vortexing (ver, e.g., Kindle, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:1228, (1990)).

20 DNA pode ser também introduzido em plantas por transferência direta de DNA em pólen como descrito por Zhou et al., Methods in Enzymology 101:433 (1983); D. Hess, Intern Rev. Cytol. 107:367 (1987); Luo et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 6:165 (1988). Expressão de ácidos nucleicos 25 codificando polipeptídeos pode ser obtida por injeção de DNA em órgãos reprodutivos de uma planta como descrito por Pena et al., Nature 325:274 (1987). Transformação pode ser também alcançada através de eletroporação de DNA estrangeiro em células espermáticas, então microinjetar as células 30 espermáticas transformadas em sacos embrionários isolados

como descrito em U.S. Patent 6.300.543 por Cass et al. DNA pode ser também injetado diretamente nas células de embriões imaturos e reidratação de embriões dissecados como descrito por Neuhaus et al., Theor. Appl. Genet. 75:30 (1987); e
5 Benbrook et al., in Proceedings Bio Expo 1986, Butterworth, Stoneham, Mass., pp. 27-54 (1986).

Embriões haplóides transformados que são derivados por qualquer das técnicas de transformação acima podem ser
10 cultivados para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado. Tais técnicas de regeneração são chamadas recuperação de embrião. Meio de recuperação de embrião pode compreender certos fito-hormônios e fontes de energia ou apenas fontes de energia. O meio de crescimento
15 pode também conter um agente de seleção, tal como um biocida e/ou herbicida. Esse agente de seleção pode ser usado para indicar um marcador que foi introduzido através do processo de transformação. Para transformação e regeneração de milho, ver, Gordon-Kamm et al., The Plant Cell 2:603-618
20 (1990).

Os métodos providos podem ser praticados com qualquer planta. Tais plantas incluem, mas não se limitam a, *Zea mays* (também identificada como milho), soja, *Brassica*,
25 alfafa, arroz, centeio, sorgo, girassol, tabaco, batata, amendoim, algodão, batata-doce, mandioca, cana-de-açúcar, tomate, aveia, cevada, e trigo.

A geração de embriões em plantas é bem conhecida na
30 arte. Técnicas de recuperação de embrião podem ser usadas

para gerar embriões duplo-haplóides imaturos em plantas (Recent Research Developments in Genetics & Breeding. Vol. 1, Part II, 287-308 2004). A revelação da mesma é aqui incorporada por referência.

5

A temperatura na qual os métodos podem ser efetuados podem variar. Os métodos providos podem ser praticados em qualquer temperatura que não mate a célula vegetal ou planta ou a partir de cerca de 16 graus Celsius a 32 graus Celsius.

10 Qualquer ou todas ou quaisquer combinações das várias etapas da invenção: isolamento de embrião, cultivo, duplicação de célula embrionária pode ser efetuado no claro ou escuro.

Todas as publicações e aplicações de patentes mencionadas nesta especificação são aqui incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação o aplicação de patente individual fosse especificamente e individualmente indicadas a serem incorporadas por referência.

20

Os seguintes exemplos são oferecidos por meio de ilustração e não por meio de limitação.

EXEMPLOS

25

EXEMPLO 1: Obtendo uma População de Plantas de Milho Duplo-Haplóides

Sementes de uma planta de milho F1 são plantadas e
30 as plantas resultantes são usadas como plantas parentais

fêmeas (receptoras de pólen). Sementes de linhagens indutoras de haploidia, como Stock 6, RWS, KEMS, KMS ou ZMS, são plantadas e as plantas resultantes são usadas como plantas parentais machos (doadoras de pólen). As

5 espigas das plantas parentais fêmeas são ensacadas antes da emergência dos estilos-estigmas. Os estilos-estigmas das espigas nas plantas parentais fêmeas são polinizados com grãos de pólen viáveis coletados das anteras de plantas parentais masculinas (plantas indutoras de

10 haploidia). Esta polinização é controlada pelo método regularmente utilizado em programas de melhoramento de milhos para evitar a contaminação por qualquer pólen estrangeiro. O método de polinização resulta na produção de uma frequência de cerca de 5-12% de embriões haplóides

15 em cada espiga. Em aproximadamente 9-14 dias após a polinização, as espigas imaturas são colhidas. As espigas têm suas superfícies esterilizadas com alvejante Clorox 30% adicionado de detergente Micro 0,5% por 20 minutos, e lavado duas vezes com água estéril. Os embriões haplóides

20 são isolados baseados na identificação do gene marcador visível nas linhagens indutoras. Por exemplo, se a linhagem indutora contiver o gene GFP ou gene CRC induzidos por um promotor que permite a expressão gênica de GFP ou CRC nos embriões no estágio precoce de

25 desenvolvimento. Promotores típicos que são úteis incluem o promotor de oleosina de milho ou promotor Lec1 de milho etc. O haplóide produzido por este sistema é um haplóide materno que tem apenas um conjunto de cromossomos da parental fêmea nas células do embrião e tem 3 conjuntos

30 de cromossomos nas células do endosperma, dois deles do

parental fêmea e um deles do parental macho. Se a linha indutora tem um marcador gênico visível, tal como GFP ou CRC, este marcador gênico será incluído apenas nas células do endosperma, mas não nas células embrionárias nos grãos haplóides. Através do uso desse tipo de marcador visível, embriões haplóides sem expressão de GFP ou CRC podem ser facilmente identificados a partir dos embriões com expressão de GFP ou CRC.

10 Os embriões haplóides de milho são isolados usando um escalpelo e colocados em um meio contendo colchicina. Após aproximadamente 24 horas, os embriões são transferidos para um meio sem colchicina e colocados no escuro. Estes embriões duplo-haplóides serão uma
15 população heterogênea de embriões homozigotos. Após aproximadamente 6-10 dias, as plântulas podem ser transferidas para uma sala de cultivo iluminada. Aproximadamente 7-14 dias mais tarde, as plântulas são transferidas para superfícies contendo terra e cultivadas
20 por 1 semana em uma câmara de crescimento, subsequente mente crescidas por 1-2 semanas adicionais em uma estufa, depois transferidas para potes e crescidas até maturidade. Essas plantas serão uma população heterogênea de plantas duplo-haplóides. Estas plantas
25 férteis de milho duplo-haplóides podem ser autofertilizadas e avaliadas para propósitos de reprodução.

EXEMPLO 2: Obtendo plantas de milho duplo-haplóides pela duplicação de cromossomos em embriões imaturos.

Métodos

Uma planta de milho diplóide, "A", foi polinizada com uma linha haplóide indutora contendo GFP. Embriões imaturos foram isolados 12 dias após a polinização e o tamanho do embrião variou entre 1,9-2,0 mm de comprimento. Os embriões diplóides, embriões expressando GFP, foram descartados. Os embriões haplóides, baseado na ausência de expressão do marcador GFP, foram cultivados em um meio contendo sais MS, vitaminas MS, tiamina, asparagina, BAP, sacarose, gelrite, e colchicina 0,05% com o escutelo virado para cima por 24 horas a 26C no escuro. Estes embriões foram, então, cultivados com o escutelo virado para baixo por 6-10 dias a 26C no escuro em um meio que não continha agente de duplicação. O meio continha sais MS, vitaminas MS, mio-inositol, sacarose, e gelrite. As plântulas germinadas destes embriões tratados foram transferidas para uma sala de cultura iluminada a 26C por mais 2-3 semanas até que se desenvolvessem plântulas saudáveis com boas raízes. Estas plântulas foram transferidas para solo e crescidas em uma estufa comum até maturação. As plantas foram autopolinizadas e as sementes maduras serão colhidas. As sementes colhidas de cada planta serão cultivadas como de uma fila de espigas e as plantas serão examinadas para a uniformidade de morfologia da planta em cada fileira de espigas.

Resultados

Espiga	#	Total	Embriões	Plântulas	Plântulas	Plantas
--------	---	-------	----------	-----------	-----------	---------

	de Embriões	Haplóides	Germinadas	para a Estufa	completamente férteis
1	71	3	3	2	2
2	60	7	5	5	4*
3	101	9	8	8	8
Soma	232	19 (8,2%)	16 (84,2%)	15	14 (93,3%)

* Uma planta neste grupo apresenta parte do coruto desprendendo pólen.

EXEMPLO 3: Obtendo Plantas de Milho Duplo-Haplóides

5

Métodos

Duas linhas diferentes de milho diplóide, "B" e "C", foram polinizadas com uma linha indutora haplóide, contendo GFP homozigoto. Embriões imaturos foram isolados 11 dias após a polinização e o tamanho do embrião variou de 1,5-1,6 mm em comprimento. Os embriões diplóides, embriões apresentando expressão de GFP, foram descartados. Os embriões haplóides, embriões não expressando GFP, foram cultivados em um meio MS modificado contendo pronamida 5uM com o escutelo voltado para cima por 48 horas a 26C no escuro. Após aproximadamente 48 horas os embriões foram transferidos para um meio MS modificado sem o agente de duplicação. Embriões foram colocados com o escutelo voltado para baixo por 6-10 dias a 26C no escuro. As plântulas germinadas destes embriões tratados foram movidas para uma sala de cultura iluminada a 26C por outras 3 semanas até que plântulas saudáveis com boas raízes se desenvolvessem. Essas plântulas eram então transferidas para solo e

crescidas em estufas comuns até a maturação. As plantas foram autopolinizadas e as sementes maduras serão colhidas. As sementes colhidas serão plantadas como de uma fileira de espigas. As plantas com uma fileira serão examinadas para

5 uniformidade de morfologia da planta.

Resultados

Linhagem	Total de Embriões	Embriões Haplóides	Plântulas Germinadas	Plântulas para Estufa	Plantas Completamente Férteis
B	112	11	4	3	2*
C	35	4	4	3	3
Soma	147	15 (10,2%)	8 (53,3%)	6	5 (83,3%)

* Uma planta neste grupo apresenta parte do coruto

10 desprendendo pólen.

EXEMPLO 4: Sementes duplo-haplóides e linhagens duplo-haplóides derivadas da duplicação de cromossomos em embriões imaturos.

15

Sementes duplo-haplóides são obtidas através de métodos descritos nos Exemplos 1, 2 e 3. As plantas duplo-haplóides nos exemplos 1, 2 e 3 são auto-polinizadas e as sementes duplo-haplóides são formadas em cada planta duplo-haplóide.

20 As sementes produzidas em cada espiga são sementes homozigotas. Esta tabela demonstra um exemplo de sementes colhidas de 10 destas plantas duplo-haplóides.

Número da Planta	Fertilidade do Coruto	Número de Sementes Produzidas
1	Completamente fértil	99
2	Completamente fértil	11
3	Completamente fértil	245
4	Completamente fértil	175
5	Completamente fértil	97
6	Completamente fértil	183
7	Completamente fértil	188
8	Completamente fértil	124
9	Completamente fértil	154
10	Completamente fértil	275

Para verificar a homozigossidade destas linhas duplo-haplóides produzidas pela duplicação de cromossomos no estágio de embrião imaturo, as sementes produzidas de cada espiga duplo-haplóide são plantadas como de uma fileira de espiga no campo. As plantas em cada fileira da espiga são avaliadas por seus fenótipos, tais como, altura da planta, altura da espiga, número de folhas, forma da planta, forma do coruto, número de ramos do coruto, coloração da antera, coloração dos estilos-estigmas, tempo de floração, etc. Todas essas informações são usadas para verificar a uniformidade das plantas em cada fileira da espiga. Por meio destas avaliações, estas linhas duplo-haplóides são confirmadas como homozigotas. Para confirmar ainda mais a homozigossidade destas linhas duplo-haplóides, tecnologia de marcadores moleculares é empregada.

EXEMPLO 5: Descrição de Tratamento de Espigas Imaturas para Duplicação Haplóide.

Uma espiga de milho é polinizada com uma linhagem
5 indutora que é homozigota para o gene marcador R-nj. A espiga é colhida em torno de 6 horas a 35 dias após a polinização pelo corte da planta acima e abaixo da espiga. A extremidade inferior do talo é imersa em um grande contêiner de água. As espigas são levadas para uma câmara estéril no
10 laboratório. O talo é cortado muitas polegadas abaixo da espiga com uma faca estéril. O terço inferior da espiga é submersa em Chlorox (hipoclorito de sódio) 2,5% por 10 minutos. Toda a superfície da espiga e do talo é esfregada com etanol 70% ou uma solução de Chlorox 5%. A extremidade
15 superior cortada do talo é vedada com lanolina estéril. A terça parte inferior da espiga é colocada em água destilada estéril para lavagem por 10 minutos. A espiga é colocada em um frasco estéril de 250 ml com abertura lateral contendo meio estéril que inclui um agente duplicador como colchicina
20 ou pronamida. O contêiner pode ser qualquer um que seja apropriado às necessidades de aplicações de pequena escala ou grande escala. O papel toalha estéril pode ser usado para vedar as brechas entre o frasco e a espiga. O papel toalha e o frasco podem ser embrulhados com parafilme de modo a selar
25 o contêiner. A abertura lateral do frasco é conectada por tubulação estéril a uma bureta estéril ou contêiner separado para fornecer meio adicional ou mudar para meio novo. O fluxo de meio é controlado por um grampo no tubo. A espiga é submersa em meio líquido contendo agente duplicador por 10 a
30 48 horas e então cultivado em meio líquido se agente de

duplicação pelo resto do tempo. A espiga é cultivada no meio até a maturação do coruto. A espiga é seca e as sementes colhidas. As sementes duplo-haplóides e haplóides são identificadas com base no marcador. Por exemplo, quando o
5 marcador R-nj vem da linha indutora, as sementes resultantes haplóide e duplo-haplóides terão um embrião incolor e endosperma colorido. As sementes que são submetidas a polinização normal teriam endosperma colorido e embrião colorido. Plante as sementes duplo-haplóides e auto-polinize
10 estas plantas para produzir a próxima geração de sementes. Plante as sementes produzidas destas plantas como fileira de espiga. Cheque a uniformidade em cada fileira de espiga.

EXEMPLO 6: Segunda Descrição de Tratamento de
15 Espigas Imaturas para Haplóides.

Plantas híbridas de milho foram polinizadas por plantas haplóides indutoras. As espigas com parte do talo anexadas foram colhidas de plantas híbridas 4-6 dias após a
20 polinização (comprimento do embrião menor que 0,4 mm). Os talos eram em torno de 4-8 polegadas de comprimento para cada lado de onde as espigas estavam anexadas. As espigas e os talos anexados são esterilizados em suas superfícies com etanol 70% ou Chlorox 5%. As extremidades inferiores dos
25 talos contendo as espigas foram submersos em meio líquido contendo meio MS, vitaminas MS, sacarose, etc. e pronamida 5 uM, DMSO 0,5% por um dia a 26C. Em seguida, as espigas ainda contidas nos talos foram movidas para meio fresco contendo meio MS, vitaminas MS, sacarose etc. sem o agente duplicador
30 para permitir o desenvolvimento dos embriões e grãos. Os

embriões dentro das espigas podem ser isolados a qualquer momento após a duplicação. A recuperação dos embriões pode ser, então, usada para germinar embriões imaturos nas plantas. As plantas germinadas foram crescidas para exame de

5 fertilidade.

Resultados

Número da Espiga	Colheita da Espiga/Talo	Número de Plantas para Estufa	Número de Plantas com Coruto Fértil	Número de Plantas com Coruto Estéril	% de Plantas com Coruto Fértil
1	6 dias após polinização	24	16	8	67%
2	6 dias após polinização	32	30	2	94%
3	5 dias após polinização	20	14	6	70%
4	4 dias após polinização	20	19	1	95%
Soma		96	79	17	82%

10 EXEMPLO 7: Descrição do Tratamento de Espigas Imaturas para Duplicação de Haplóide Enquanto a Espiga está na Planta.

Uma espiga de milho é polinizada com uma linha

15 indutora. Em torno de 6 horas a 35 dias após a polinização,

a planta é recolhida e as raízes da planta são imersas em um recipiente de solução de nutrientes contendo agente de duplicação. As raízes da planta são submersas em meio líquido contendo o agente de duplicação por 10 a 48 horas e
5 então movidas para nova solução nutriente hidropônica pelo resto do tempo. Exemplos de agentes de duplicação incluem, mas não estão limitados a, pronamida, carbetamida, orizalina e colchicinas. É permitido que a espiga se desenvolva. Os embriões duplo-haplóides podem ser isolados a qualquer
10 momento após o tratamento duplicador. A recuperação dos embriões pode se realizada ou a espiga pode ser desenvolvida até a maturação dos grãos. É permitida à espiga a maturação das sementes podem ser secas e as sementes colhidas. As sementes duplo-haplóides e haplóides podem ser identificadas
15 com base no marcador. Por exemplo, se o marcador R-nj vier da linhagem indutora as sementes haplóides e duplo-haplóides resultantes terão embrião incolor e endosperma colorido. As sementes que sofrerem polinização normal teriam endosperma colorido e embrião colorido. Plante as sementes duplo-
20 haplóides e autopolinize estas plantas para produzir a nova geração de sementes. Plante as sementes produzidas destas plantas como fileira de espiga. Verifique a uniformidade em cada fileira de espiga.

25 EXEMPLO 8: Descrição da Obtenção de Plantas Duplo-Haplóides por Indução de Broto

Um embrião haplóide é isolado 6-12 dias após a polinização. O embrião haplóide é colocado com o eixo virado
30 para cima em meio contendo agente de duplicação cromossomal

por 24 a 48 horas. O embrião haplóide duplicado (ou uma planta excisada contendo o meristema apical) é então colocado em um meio de proliferação de broto (meio SP) com o eixo voltado para cima (escutelo voltado para baixo). Meio de proliferação de broto contém sais MS e vitaminas com 2-benziladenina 2 mg/L, sacarose 2% e ágar TC 9 g/L (ver Lowe et al., 1995, *Biotechnology* 13:677-682), mas além de elevados níveis de citoquinina tal meio SP pode conter baixos níveis de auxinas como 2,4-D ou IBA (como em Zhong e tal., 1992, *Planta* 187:483-489). Depois da formação de múltiplos brotos no meio SP, eles são transferidos para um meio de regeneração de brotos (também denominado meio de alongamento de brotos), que consiste de meio MS com um nível ótimo de citoquinina. Para alguns genótipos, nenhuma citoquinina é o ótimo para alongamento de broto, enquanto para outros genótipos alguma citoquinina é necessária (i.e. zeatina 10 mg/l). Uma vez que a regeneração do broto acontece, os brotos são transferidos para meio de iniciação de raiz, por exemplo um meio MS não contendo auxinas ou citoquininas. Se as plântulas tiverem dificuldade de formar raízes na ausência de auxina, o enraizamento é promovido pela cultura em meio MS (Murashige e Skoog) ou SH (Shenk e Hildebrandt) com NAA 1 mg/l, ou por entalhamento na base do talo com um escalpelo e imersão do broto em solução de NAA 1 mg/l. Plântulas duplo-haplóides são então transferidas para uma câmara de crescimento e finalmente transplantadas para uma estufa para crescimento até maturidade e produção de sementes. Sementes de plantas duplo-haplóides são crescidas e testadas para homozigosidade usando análise com marcadores moleculares e observações fenotípicas.

Como alternativa ao uso do agente de duplicação no embrião haplóide antes do cultivo, embriões ou explantes de embriões contendo o meristema apical podem ser colocados em
5 meio SP, e uma vez iniciada a proliferação do broto a cultura de múltiplos brotos pode ser exposta ao agente de duplicação de cromossomo por 24-48 horas. O tecido é então transferido para meio SP fresco para continuar a proliferação do meristema ou pode ser movido para meio de
10 iniciação de raiz.

EXEMPLO 9: Testando Diferentes Híbridos e Tempo do Agente Duplicador

15 Uma linha de milho materna haplóide indutora foi utilizada para polinizar 4 plantas híbridas diferentes. Os embriões imaturos híbridos derivados destes cruzamentos foram isolados e colocados diretamente em meio de recuperação de embriões contendo pronamida 5uM. Embriões
20 foram mantidos no meio de pronamida por aproximadamente 36 ou 48 horas antes de serem transferidos para novo meio sem o agente de duplicação.

As plântulas germinadas destes embriões tratados foram
25 então transferidas para tubos até o desenvolvimento de plântulas saudáveis com boas raízes. Estas plântulas foram então transferidas para solo e cultivadas em estufa comum até o amadurecimento. As plantas foram autopolinizadas e as sementes maduras foram colhidas. A progênie de uma amostra

de plantas duplo-haplóides foi analisada usando 120 marcadores moleculares e confirmada para homozigossidade.

Resultados

5

Genótipo Fêmea	Idade do Embrião- Dias após Polinização	Número de embriões excisados	Tamanho do Embrião (mm)	Duração do Tempo em Pronamida 5 uM (horas)	# de Plantas Duplo- haplóides com Espigas
Híbrido 1	11	100	2,5	36	1
Híbrido 2	11	176	2,5-3	36	4
Híbrido 1	12	300	2,5	36	1
Híbrido 3	12	279	2,5-3	36	13
Híbrido 4	12	322	2,5	36	2
Híbrido 3	10	236	2	48	6
Híbrido 4	10	144	2	48	3

REIVINDICAÇÕES

1. Método de obtenção de uma planta de milho duplo-haplóide caracterizado por compreender:

5

a) polinizar estigmas de uma espiga de milho com uma linhagem indutora para produzir pelo menos um embrião haplóide;

10 b) colocar em contato o referido embrião haplóide com um agente duplicador de cromossoma para produzir pelo menos uma célula embrionária duplo-haplóide;

c) gerar uma planta de milho duplo-haplóide a partir da referida célula embrionária duplo-haplóide, e;

d) onde a etapa (b) ocorre 4-21 dias após a etapa (a).

15

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que a linhagem indutora contém um gene marcador que é expresso em tecido embrionário.

20 3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato que o referido gene marcador é R-nj.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato que o gene marcador é GFP.

25

5. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato que o gene marcador é expresso em 4 ou mais dias após a polinização.

6. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato que o referido gene marcador expressa pigmentos de antocianinas.

5 7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o embrião haplóide da etapa (b) tem de 0,4 mm a 3 mm de comprimento.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
10 pelo fato que o agente duplicador de cromossoma compreende uma agente anti-microtúbulo.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato que o referido agente duplicador de cromossoma é
15 selecionado de um grupo consistindo de colchicina, pronamida, "dithiopyr", e trifluralina.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o embrião haplóide da etapa (b) é colocado
20 em contato com o agente duplicador por 4 a 48 horas.

11. Método de obtenção de semente duplo-haplóide, caracterizado por compreender:

- 25 a) obter uma semente haplóide ao polinizar um óvulo com uma linhagem indutora;
- b) colocar em contato a referida semente haplóide com um agente duplicador de cromossoma; e
- c) obter uma semente duplo-haplóide.

12. Método de obtenção de um set de grãos com embriões duplo-haplóides, caracterizado por compreender:

- 5 a) obter um set de grãos haplóides ao polinizar uma espiga com uma linhagem indutora;
- b) colocar em contato o referido set de grãos haplóides com um agente duplicador de cromossoma para obter um set de grãos com embriões duplo-haplóides.

10 13. Set de grãos com embriões duplo-haplóides de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que cada grão do set compreende uma célula de endosperma com pelo menos um set de cromossoma proveniente de um parente paterno e dois sets de cromossomas de um parente materno; e
15 onde cada grão do set compreende um embrião com um set de cromossomas homozigotos do referido parente materno.

14. Método de obtenção de um set de grãos de milho duplo-haplóide em uma espiga de milho, caracterizado por
20 compreender:

- a) obter um set de embriões haplóides ao polinizar uma espiga com uma linhagem indutora; e
- b) colocar em contato o referido set de embriões haplóides com o agente duplicador de cromossoma para obter
25 um set de grãos duplo-haplóides em uma espiga de milho.

15. Método de obtenção de uma planta de milho duplo-haplóide, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato um embrião haplóide com um meio não formador de

calo compreendendo um agente duplicador de cromossoma para produzir um embrião duplo-haplóide e gerar uma planta de milho duplo-haplóide a partir do referido embrião duplo-haplóide.

5

16. Método de obtenção de um embrião de milho duplo-haplóide, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato um embrião haplóide com um meio não formador de calo compreendendo um agente duplicador de cromossoma para
10 produzir um embrião duplo-haplóide.

17. Método de obtenção de uma planta de milho duplo-haplóide, caracterizado por compreender:

- 15 a) colocar em contato a célula embrionária haplóide com um agente duplicador de cromossoma para produzir uma célula embrionária duplo-haplóide;
- b) colocar em contato a referida célula embrionária haplóide com um meio de formação de múltiplas gemas para
20 gerar um ápice aéreo;
- c) gerar uma planta de milho duplo-haplóide a partir do referido ápice aéreo;

B0616315 - 0

RESUMO

MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UMA PLANTA DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE,
DE SEMENTE DUPLO-HAPLÓIDE, DE UM SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES
DUPLO-HAPLÓIDES, DE UM SET DE GRÃOS DE MILHO DUPLO-HAPLÓIDE
5 EM UMA ESPIGA DE MILHO, DE UM EMBRIÃO DE MILHO DUPLO-
HAPLÓIDE E SET DE GRÃOS COM EMBRIÕES DUPLO-HAPLÓIDES

São fornecidos métodos para produzir plantas,
sementes, e células vegetais de milho duplo-haplóide (Zea
10 mays).