



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

(21) PI 0806864-0 A2



(22) Data de Depósito: 31/01/2008
(43) Data da Publicação: 29/04/2014
(RPI 2260)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/82
A01H 5/00

(54) Título: MÉTODO DE SELEÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES, MÉTODO DE DESENVOLVIMENTO DE UMA LINHAGEM INDUTORA HAPLÓIDE DE MILHO TRANSFORMADA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES E EMBRIÕES DIPLÓIDES NÃO-VIÁVEIS EM UMA PLANTA, MÉTODO DE SELEÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES, LINHAGENS INDUTORAS HAPLÓIDES DE MILHO TRANSGÊNICO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 02/02/2007 US 60/887,828

(73) Titular(es): E.I. Du Pont de Nemours and Company, Pioneer Hi-Bred International, Inc.

(72) Inventor(es): Mark E. Williams, William J. Gordon-Kamm

(74) Procurador(es): Ana Cristina Müller Wegmann

(86) Pedido Internacional: PCT US2008052563 de 31/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/097791 de 14/08/2008

MÉTODO DE SELEÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES, MÉTODO DE DESENVOLVIMENTO DE UMA LINHAGEM INDUTORA HAPLÓIDE DE MILHO TRANSFORMADA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES E EMBRIÕES DIPLÓIDES NÃO-VIÁVEIS EM UMA PLANTA,
5 **MÉTODO DE SELEÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES, LINHAGENS INDUTORAS HAPLÓIDES DE MILHO TRANSGÊNICO**

A INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito ao campo do
10 melhoramento vegetal e biotecnologia vegetal.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Plantas homozigóticas são fundamentais para o desenvolvimento de produtos e comercialização de plantas.
15 Para obter plantas homozigóticas são exigidas várias gerações de autopolinização e análise de segregação. Este é um uso ineficiente de mão de obra e tempo. Por isso, seria útil desenvolver um método para reduzir os passos manuais de polinização normalmente necessários para obter
20 uma planta homozigótica e reduzir a quantidade de tempo necessário para obter uma população homozigótica de plantas. Uma maneira de obter plantas homozigóticas sem a necessidade de se autopolinizar várias gerações é produzir haplóides e, em seguida, duplicar os cromossomos
25 para formar haplóides duplicados. Um processo para auxiliar na seleção de embriões haplóides e eliminação de embriões diplóides aumentaria a eficiência da produção de haplóides duplicados.

RESUMO DA INVENÇÃO

Métodos para identificar haplóides por impedimento do crescimento dos embriões diplóides são fornecidos. Métodos para identificar plantas haplóides, sementes, embriões e células vegetais são fornecidos. Métodos para produzir linhagens indutoras haplóides e as linhagens indutoras haplóides são fornecidos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10 Uma planta haplóide tem um único conjunto (genoma) de cromossomos e o número reduzido de cromossomos (n) da planta haplóide é igual ao do gameta.

Uma planta diplóide tem dois conjuntos (genomas) de cromossomos e o número cromossômico ($2n$) é igual ao do zigoto.

Uma célula haplóide é uma com um único genoma, masculino ou feminino.

20

Um haplóide duplicado ou planta haplóide duplicada ou célula é um que é desenvolvido pela duplicação de um conjunto haplóide de cromossomos. Uma planta ou semente que é obtida a partir de uma planta haplóide duplicada e por qualquer número de gerações pode ainda ser identificada como uma planta haplóide duplicada. Uma planta haplóide duplicada é considerada uma planta homozigótica. Uma planta é considerada haplóide duplicada se é fértil, mesmo se toda a parte vegetativa da planta não consistir de células com o dobro do conjunto de

cromossomos. Por exemplo, uma planta será considerada uma planta haplóide duplicada se contiver gametas viáveis, mesmo que eles sejam quiméricos.

5 Um "embrião haplóide" é definido como o embrião formado após um núcleo espermático de um grão de pólen fusionar com os núcleos polares no saco embrionário para criar um endosperma triplóide (3N) e o embrião se forma sem a contribuição do genoma masculino.

10

Um "embrião imaturo haplóide" é definido como o embrião formado após um núcleo espermático de um grão de pólen fusionar com os núcleos polares no saco embrionário para criar um endosperma triplóide (3N) e antes da
15 secagem. E o embrião se forma sem a contribuição do genoma masculino.

Um "embrião haplóide duplicado" é um embrião que tem uma ou mais células que contêm 2 conjuntos de cromossomos
20 homozigotos.

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

25 As frases "contato", "entrar em contato com" ou "colocada em contato com" podem ser usadas para significar "contato direto" ou "contato indireto". Por exemplo, um meio compreendendo um agente de duplicação pode ter contato direto com as células haplóides ou o
30 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.

5

O termo "meio" inclui compostos no estado líquido, gasoso, ou no estado sólido.

Conforme utilizado aqui, o termo "planta" inclui a
10 referência a todas plantas, órgãos vegetais (por exemplo, folhas, caules, raízes, etc), sementes e células vegetais e progênies da mesma. "Célula vegetal" , como utilizado neste documento, inclui, sem limitação, sementes, culturas em suspensão, embriões, regiões meristemáticas,
15 calos teciduais, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen, e micrósporos.

A linhagem indutora haplóide inclui: 1) um polinucleotídeo de letalidade do pólen ou um
20 polinucleotídeo do pólen de não-transmissão, 2) polinucleotídeo de letalidade do embrião, e 3) um repressor de letalidade do embrião.

O polinucleotídeo de letalidade do pólen ou um
25 polinucleotídeo do de não-transmissão de pólen indica qualquer polinucleotídeo que impede o pólen de alcançar fertilização. O pólen de não-transmissão é mais eficaz se ocorrer na fase pós-meiótica ou gametofítica. O polinucleotídeo do pólen de não-transmissão pode
30 trabalhar através de diferentes mecanismos. Pode impedir

que o pólen seja viável, por exemplo, por expressão de um composto tóxico.

O polinucleotídeo de letalidade do embrião é
5 qualquer polinucleotídeo que impede o bom desenvolvimento
do embrião ou causa o embrião a ser não-viável. O
polinucleotídeo de letalidade do embrião pode retardar o
crescimento do embrião, tanto que um pode ser capaz de
distinguir um embrião que transporta polinucleotídeo de
10 letalidade do embrião de um embrião que não carrega o
polinucleotídeo de letalidade do embrião.

O repressor de letalidade do embrião é qualquer
polinucleotídeo que quando expresso motiva o
15 polinucleotídeo de letalidade do embrião a ser não eficaz
e permite que um embrião viável se desenvolva. Isto pode
ser conseguido através de diversos mecanismos. Por
exemplo, o repressor de letalidade do embrião pode
desintoxicar a molécula expressa pelo polinucleotídeo de
20 letalidade do embrião. Uma proteína repressora de embrião
pode ser expressa tal que inibe a letalidade de uma outra
proteína, por exemplo, através de uma interação proteína-
proteína. Outra forma do repressor do embrião poder
trabalhar é dissuadir ou impedir a expressão do
25 polinucleotídeo de letalidade de embrião, por exemplo,
expressando uma molécula que se liga ao promotor do
polinucleotídeo de letalidade e bloqueando algumas ou
todas as expressões. Outro exemplo que poderia ser
utilizado no sistema é o silenciamento gênico. Por
30 exemplo, o repressor de embrião pode ser um

polinucleotídeo que impede o polinucleotídeo de embrião letal do funcionamento através do silenciamento gênico.

O polinucleotídeo de letalidade do embrião e o
5 polinucleotídeo repressor de letalidade do embrião não
estão limitados a serem expressos apenas no embrião. Os
genes podem ser expressos em outros tecidos. É mais
eficaz se o polinucleotídeo de letalidade do embrião não
é expresso no endosperma de modo que a semente haplóide
10 possa desenvolver normalmente. Outra consideração para o
método de trabalho, no seu ótimo é a de que a expressão
do polinucleotídeo de letalidade do embrião deva ser
acompanhada pela expressão do polinucleotídeo repressor
de letalidade do embrião. Sempre os polinucleotídeos que
15 são herdados conjuntamente com o polinucleotídeo
repressor de letalidade do embrião devem ser expressos a
um nível de impedir os efeitos negativos do
polinucleotídeo de letalidade do embrião.

20 Normalmente, o polinucleotídeo do pólen de não-
transmissão e o repressor de letalidade do embrião estão
ligados na linhagem indutora desenvolvida. Eles podem ser
estritamente ligados. Para a conveniência, a maioria dos
polinucleotídeos do pólen de não-transmissão e o
25 repressor de letalidade do embrião devem ser adjacentes
uns aos outros, por exemplo, sobre o mesmo construto.
Para resultados eficientes o polinucleotídeo do pólen de
não-transmissão e o repressor de letalidade do embrião
vão segregar juntos. Também tipicamente, o
30 polinucleotídeo do pólen de não-transmissão e o repressor

de letalidade do embrião estão ligados, mas estão em um local diferente do que o polinucleotídeo de letalidade do embrião. Para resultados eficientes, o polinucleotídeo de letalidade do embrião vai segregar a partir do
5 polinucleotídeo do pólen de não-transmissão e o repressor de letalidade do embrião. Para a maior eficiência, o polinucleotídeo de letalidade do embrião não está relacionado com o polinucleotídeo do pólen de não-transmissão e o repressor de letalidade do embrião.

10

A linhagem indutora desenvolvida pode ou não conter marcadores selecionáveis. Pode ou não ser desenvolvida usando transgenes que são marcadores selecionáveis.

15 A seguir são descritos os componentes típicos para produzir uma linhagem indutora. O Constructo A compreende um polinucleotídeo do pólen de não-transmissão e repressor de letalidade de embrião, e um gene marcador selecionável. O Constructo B compreende um gene marcador
20 selecionável e um gene de letalidade de embrião. Para facilitar a separação após a polinização os dois constructos podem ser localizados em dois locais diferentes no genoma. Para mais eficiência o Constructo A e o Constructo B devem ser ligados.

25

Constructo A e B podem ser co-transformados em linhagem indutora ou o processo de transformação pode ser feito sequencialmente, mais convenientemente com o Constructo A primeiro e o Constructo B em segundo. A
30 primeira planta indutora T_0 será heterozigota para ambos

os construtos, A e B. Os resultados esperados da autopolinização desta planta são apresentados na Tabela 1.

5 Outra forma de introduzir os constructos na linhagem indutora seria cruzar ou reproduzi-los na linhagem indutora. Por exemplo, Constructo A e B poderiam ser co-transformados em uma planta e, em seguida, reproduzidos em uma linhagem indutora. Para que o sistema seja o mais
10 eficiente em plantas, o repressor de embrião letal precisa estar presente com o polinucleotídeo de embrião letal. Portanto, um pode transformar com o constructo contendo o polinucleotídeo repressor de embrião letal para obter células transformadas estavelmente e, em
15 seguida, transformar com o constructo compreendendo o polinucleotídeo de embrião letal.

Tabela 1. A autopolinização de uma planta T_0 co-transformada em 2 locos segregantes (genótipo (AB-)). A
20 produção da planta T_0 é possível porque tanto o embrião letal quanto o repressor de embrião letal são ambos expressos em embriões somáticos e calos embriogênicos. O pólen contendo o Constructo A é não-viável ou não-transmissível. Embriões contendo o Constructo B, mas não
25 o Constructo A são não-viáveis devido à expressão do gene do embrião letal sem o gene repressor do embrião letal. O genótipo A-BB terá duas doses de gene do embrião letal e uma dose do gene repressor do embrião. Assim, para a maior eficiência, a expressão de um único polinucleotídeo

repressor deve ser fixada num nível que impeça letalidade de duas doses do polinucleotídeo do embrião letal.

Constructo A = pólen não-transmissão + repressor de
5 embrião letal + gene marcador selecionável "a"

Constructo B = embrião letal + marcador selecionável
"b"

	Gametas Masculinos				
		AB	A-	-B	--
Gametas Femininos	B	não-transmissão de pólen	não-transmissão de pólen	Embrião viável A-BB	Embrião viável A-B-
	-	não-transmissão de pólen	não-transmissão de pólen	Embrião viável A-B-	Embrião viável A--- mas sensível ao agente marcador selecionável b
	B	não-transmissão de pólen	não-transmissão de pólen	Embrião letal --BB	Embrião letal --B-
	-	não-transmissão de pólen	não-transmissão de pólen	Embrião letal --B-	---- Embrião viável mas sensível ao agente marcador selecionável (a e b)

Porque haverá embriões viáveis sem ambos construtos,
10 os embriões ou plantas de embriões que não contenham os
dois construtos podem ser selecionados contra, contatando
o tecido com o agente selecionável. Se o marcador
selecionável é um marcador visual, ou algum outro tipo de
marcador, isto também pode ser observado e os tecidos não
15 contendo dois marcadores podem ser selecionados em
comparação. Qualquer tipo de marcador selecionável pode

ser utilizado. As plantas restantes vão ser heterozigóticas para os dois construtos (A-B-) ou heterozigóticas para o constructo A e homozigótica para o constructo B, (A-BB). O resultado de autopolinização do

5 genótipo AB- resultará na progênie como visto anteriormente, Tabela 1. O resultado de autopolinização do genótipo A-BB resultará apenas genótipos que são homozigotos para o Constructo B. Por conseguinte, todos os descendentes terão o marcador selecionável b. Este é o

10 genótipo desejado, A-BB. As plantas que são heterozigóticas para ambos os constructos irão produzir alguns descendentes que não contenham marcador selecionável b. A progênie resultante de autopolinização dos genótipos A-BB está descrita na Tabela 2.

15

Tabela 2. Autopolinização de plantas T_1 tendo genótipo A-BB. Toda a progenia viável da autopolinização de plantas A-BB serão plantas A-BB.

Gametas Femininos	Gametas Masculinos		
		AB	-B
	AB	não-transmissão de pólen	Embrião viável A-BB
	-B	não-transmissão de pólen	Embrião letal --BB

20 O genótipo desejado, A-BB, produz apenas um genótipo de pólen viável, -B. Quando esta linhagem indutora transgênica é atravessada como um macho a uma fêmea do tipo selvagem, isso resultará na ablação de todos os embriões diplóides, Tabela 3. No entanto embriões

25 haplóides maternos não herdam o embrião letal do

progenitor masculino e, portanto, são viáveis. Os haplóides maternos não contêm os transgenes do Constructo A ou Constructo B.

- 5 Embora o embrião haplóide materno não herde o DNA do progenitor masculino, o pólen que transporta o gene de embrião letal terá um núcleo espermatozóide que funde com núcleos polares no saco embrionário para criar um endosperma triplóide (3N). Assim, o gene de embrião letal
- 10 não pode ser expresso no endosperma ou aleurona, ou se é expresso nestas células não vai matar o embrião haplóide.

- Tabela 3. Cruzamento da linhagem indutora haplóide, com o genótipo A-BB, com uma linhagem feminina do tipo selvagem, ----. Pólen contendo Constructo A e embriões
- 15 contendo Constructo B são não viáveis devido à expressão do embrião letal sem a expressão do repressor do embrião letal. Diplóides herdam Constructo B do sexo masculino e são não viáveis. Haplóides maternos não herdam Constructo
- 20 B e são viáveis. Quaisquer embriões maternos que se desenvolvam normalmente serão haplóides.

Gametas Femininos (tipo selvagem)	Gametas Masculinos (linhagem indutora)			
		AB	-B	Sem contribuição masculina
--		não-transmissão de pólen	Embrião letal	-- Haplóide materno

- O desenvolvimento de uma linhagem indutora também poderia ser produzido sem quaisquer marcadores
- 25 selecionáveis. Também poderia ser produzido com apenas um marcador selecionável em ambos os constructos ou com o

mesmo marcador selecionável em ambos os construtos. Poderia utilizar qualquer número de técnicas conhecidas no estado da técnica para monitorar e reproduzir os transgenes. Por exemplo, testes de progenia, PCR, marcadores moleculares, ou ELISA podem ser utilizados para monitorar os transgenes. Também qualquer combinação de técnicas poderia ser utilizada. Por exemplo, se um primeiro constructo = não-transmissão de pólen + repressor de embrião letal e um segundo constructo = embrião letal, PCR quantitativo poderia ser utilizado para determinar qual a descendência que continha qual constructo e em que dose, estado homozigótico ou estado heterozigótico.

Outro método da invenção inclui co-transformação com a não-transmissão do pólen e genes repressores de embrião letal em um constructo e um gene marcador selecionável em um segundo constructo. Após a obtenção dos tecidos transformados uma segunda co-transformação pode ser realizada com o embrião letal e um segundo marcador selecionável. Após plantas transgênicas serem desenvolvidas, marcadores selecionáveis podem ser separados para longe dos outros transgenes.

Outro método pode ser utilizado com aplicação química ou contato agindo como o repressor de embrião letal. Pode-se obter plantas com apenas Constructo B se uma substância química for usada para reprimir o polinucleotídeo de embrião letal. Por exemplo, poderia transformar os constructos em duas plantas diferentes e,

em seguida, reproduzir ambos os construtos na linhagem indutora. O produto químico que reprime a letalidade do embrião teria de ser utilizado para a planta transformada com Constructo B até ambos os construtos estarem contidos na mesma planta. Em seguida, selecionaria a linhagem indutora que contivesse os dois construtos segregados, A e B. O traço de integração através dos retrocruzamentos é bem conhecido no estado da técnica.

- 10 Sistemas de indução haplóides foram desenvolvidos para diferentes plantas para produzir tecidos haplóides, plantas e sementes. O sistema de indução haplóide pode produzir plantas haplóides a partir de qualquer genótipo por cruzamento de uma linhagem selecionada (como
- 15 feminina), com uma linhagem indutora. Essas linhagens indutoras de milho incluem, mas não estão limitadas a, Stock 6 e derivados de Stock 6 (Coe, 1959, Am. Nat. 93: 381-382; Sarkar e Coe, 1966, Genetics 54: 453-464; Sarkar et al, 1972, Development of maternal-haploidy-inducer
- 20 lines in maize (Zea mays L.) Indian J. Agric. Sci. 42: 781-786; Lashermes e Beckert, 1988, Genetic control of maternal haploidy in maize (Zea mays L.) and selection of haploid inducing lines. Theor. Appl. Genet. 76: 405-410; Chalyk, S.T. 1994, Properties of maternal haploid maize
- 25 plants and potential application to maize breeding. Euphytica 79, 13-18; Bordes, J.R. et al . 1997, Haploidization of maize (Zea mays L.) through induced gynogenesis assisted by glossy markers and its use in breeding. Agronomie 17: 291-297; Eder J. e S. Chalyk,
- 30 2002 In vivo haploid induction in maize. Theor. Appl.

Genet. 104: 703-708) RWS (Rober, Gordillo, e Geiger, 2005, Maydica 50 (2005) 275-283), KEMS (Deimling, Roeber, e Geiger, 1997, Vortr. Pflanzenzuchtg 38:203 -224), ou KMS e ZMS (Chalyk, Bylich & Chebotar, 1994, MNL 68:47; 5 Chalyk & Chebotar, 2000, Plant Breeding 119:363-364), e indeterminate gametophyte (ig) mutation (Kermicle 1969 Science 166: 1422-1424). As divulgações são incorporadas neste documento por referência.

10 Vasta hibridização cruzada também pode ser usada para produzir haplóides. Em cevada, este método é muitas vezes referido como o método bulbosum (Kasha e Kao, 1970, Nature 225: 874-876). Este método de produção haplóide ocorre devido à eliminação dos cromossomos a partir da 15 polinização materna.

Quando uma linhagem indutora é usada para polinizar uma planta diplóide, embriões haplóides são derivados. Um núcleo espermático do pólen funde com os núcleos polares 20 no saco embrionário para criar um endosperma triplóide (3N). O endosperma triplóide irá conter 2 conjuntos de cromossomos femininos e 1 conjunto de cromossomos masculinos, que neste caso é a linhagem indutora. O embrião haplóide contém um único conjunto de cromossomos, 25 que são derivados da planta feminina.

No desenvolvimento de milho haplóide, *Rnj* é um alelo comumente utilizado para rastreamento haplóide / diplóide de sementes maduras (Nanda e Chase, 1966. An embryo 30 marker for detecting monoploids of maize (*Zea mays* L).

Crop Sci. 6: 213-215; Greenblatt e Bock, 1967. A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. J. Hered. 58:9-13). Níveis de expressão R-nj demonstraram ser correlacionados com os
5 parâmetros da maturação do núcleo (Alexander e Cruz, 1983, Grain fill characteristics of early maize (*Zea mays* L) strains selected for variable R-nj expression, Euphytica 32: 839-844.). Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower
10 primordial stage. Plant breeding 121: 370-377; e Kato A., 2003, Chromosome doubling method, Publicação US 2003/0005479).

O gene marcador R-nj da antocianina usado para
15 distinguir haplóides e diplóides na fase de semente madura não é expresso até tarde no desenvolvimento embrionário. Para identificar tecido haplóide numa fase anterior, embriões haplóides podem ser identificados através de um marcador transgênico, *lecl1-GFP*, que está
20 presente na linhagem indutora. A utilização de *lecl1-GFP* é valiosa, porque o gene permite identificar embriões não-haplóides numa fase precoce do desenvolvimento do embrião (Pedido de Patente US 09/718.754, Patente US 6.486.382). A ausência da expressão do marcador GFP é usada para
25 identificar embriões haplóides. Embora os embriões haplóides possam ser identificados numa fase inicial, o sistema GFP exige um trabalho intenso de processo de triagem para determinar quais embriões expressam o marcador GFP e quais embriões não expressam o marcador
30 GFP. A utilização de um marcador letal em uma linhagem

indutora só permite formação embrionária haplóide e, assim, elimina a necessidade de um processo menos eficiente de rastreamento. Este sistema aumentaria a eficiência do processo de haplóide duplicado.

5

Vários tipos de sistemas podem ser utilizados na linhagem indutora, a fim de aumentar a eficiência do processo de haplóide duplicado: 1) sistemas de toxicidade/antídoto 2) sistemas reguladores transcrpcionais 3) sistemas de silenciamento gênico.

Um exemplo de um sistema de toxicidade/antídoto que pode ser utilizado é o sistema Barnase/Barstar. Barnase é o nome da ribonuclease extracelular produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*. O inibidor da barnase é chamado barstar e é produzido intracelularmente pelo mesmo organismo que secreta barnase. A função do barstar é proteger a *B. amyloliquefaciens* dos efeitos tóxicos da barnase intracelular, tornando-a inativa (Hartley, R.W. (1989) Barnase and barstar: Two small proteins to fit and fold together. Trends Biochem. Sci. 14: 450-454). Ambos os genes foram clonados e sequenciados (Hartley, R.W. (1988) Barnase and barstar: Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. J. Mol. Biol. 202: 913-915). Foi demonstrado que a expressão de barnase é letal para células vegetais, e que barstar pode proteger uma célula vegetal contra os efeitos da barnase (Mariani et al., (1990) Induction of male-sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. Nature 347: 737-741; Mariani et al. (1992) A chimeric

ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature 357: 384-387; Beals, T.P. e Goldberg, R.B. (1997) A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. Plant Cell 9: 1527-1545; Williams et al., (1997) Male sterility through recombinant DNA technology. Em Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, K.R. Shivanna and V.K. Sawhney, eds (Cambridge, UK: Cambridge University Press) pp 237-257). A transmissão de um transgene através do pólen pode ser evitada através de uma ligação entre o transgene e o gene de letalidade do pólen composto de um gene citotóxico sob o controle de um promotor pólen-específico (gametófito) (Twell (1995) Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. Protoplasma 187: 144-154; Williams et al., (1997) Male sterility through recombinant DNA technology. Em Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, K.R. Shivanna and V.K. Sawhney, eds (Cambridge, UK: Cambridge University Press) pp 237-257). Este tipo de construção pode ser mantido porque é transmitido através da fêmea. Muitos promotores pólen-específicos têm sido identificados. Outros experimentos da invenção incluem constructos que podem dissuadir a viabilidade da antera ou qualquer constructo que impeça a transmissão de pólenes viáveis. Barstar inibe a função (RNase) da proteína barnase na linhagem indutora haplóide. Embriões diplóides são ablacionados porque o PTU (unidade de transcrição da planta) de barstar está ligado ao PTU de não-transmissão do pólen e, portanto, não está presente nos embriões

diplóides para inibir barnase. O sistema barstar pode ser melhorado por meio da otimização da região codificadora do gene barstar. Pode-se também otimizar o sistema aumentando a afinidade do barstar para barnase. Outras

5 formas de melhorar o sistema incluem o aumento da expressão de barstar sobre o nível de expressão de barnase de modo a que o nível de expressão seja, por exemplo, cerca de 1.5X, 2X ou, pelo menos, 3X o nível da expressão da barnase. Pode ter barnase regulada por um

10 promotor preferido do embrião, por exemplo, lecl1, e ter barstar regulado por um promotor constitutivo, por exemplo, Ubi. Pode também adicionar íntrons, como íntrons Adh, ou adicionar potenciadores, como potenciadores 35S a fim de aumentar a expressão. Íntrons talvez sejam

15 necessários no polinucleotídeo que expressa um produto tóxico para ter o efeito de impedir a expressão de produto tóxico na *Agrobacterium*.

Existem muitos exemplos de sistemas reguladores

20 transcricionais que podem ser utilizados (Ramos et al. "The tetr family of transcriptional repressors" (2005) Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 69(2): 326-356). Alguns exemplos de famílias de reguladores estão indicados na Tabela 4.

25

Tabela 4. Famílias de reguladores

Família	Ação	Exemplos de funções reguladas	Motivo de ligação de DNA	Posição
LysR	Ativador/repressor	Metabolismo do carbono e do nitrogênio	Hélice-volta-hélice	N-terminal

AraC/XylS	Ativador	Metabolismo do carbono, resposta ao stress e patogênese	Hélice-volta-hélice	C-terminal
TetR	Repressor	Biossíntese de antibióticos, bombas de efluxo, stress osmótico, etc.	Hélice-volta-hélice	C-terminal
LuxR	Ativador	Sensoriamento de quorum, biossíntese e metabolismo, etc.	Hélice-volta-hélice	C-terminal
LacI	Repressor	Utilização de fonte de carbono	Hélice-volta-hélice	N-terminal
ArsR	Repressor	Resistência ao metal	Hélice-volta-hélice	Central
IcIR	Repressor/ativador	Metabolismo do carbono, bombas de efluxo	Hélice-volta-hélice	N-terminal
MerR	Repressor	Resistência e detoxificação	Hélice-volta-hélice	N-terminal
AsnC	Ativador/repressor	Biossíntese de aminoácidos	Hélice-volta-hélice	N-terminal
MarR	Ativador/repressor	Resistência múltipla a antibióticos	Hélice-volta-hélice	Central
NtrC (EBP)	Ativador	Assimilação de nitrogênio, síntese de aminoácidos aromáticos, flagelo, vias catabólicas, resposta a fagos etc.	Hélice-volta-hélice	C-terminal
OmpR	Ativador	Metais pesados e virulência	Hélice alada	C-terminal
DeoR	Repressor	Metabolismo do açúcar	Hélice-volta-hélice	N-terminal
Cold shock	Ativador	Resistência a baixa temperatura	Domínio de ligação a RNA (CSD)	Variável
GntR	Repressor	Metabolismo geral	Hélice-volta-hélice	N-terminal
Crp	Ativador/repressor	Respostas globais, repressão catabólica e anaerobiose	Hélice-volta-hélice	C-terminal

Um sistema regulador bem estudado que pode ser utilizado para identificar haplóides no início do desenvolvimento é o sistema repressor tet. O sistema operon da tetraciclina compreende elementos repressores e operadores. O sistema operon é controlado pela presença de tetraciclina, e auto-regula o nível de expressão de genes *tetR* e *tetA*. O produto de *tetA* remove a tetraciclina da célula. O produto de *tetR* é a proteína repressora que se liga aos elementos operadores com um K_d de cerca de 10 pM na ausência de tetraciclina, bloqueando, assim, a expressão ou *tetA* e *tetR*. O repressor TET pode ser otimizado para o milho e o promotor utilizado para parar o desenvolvimento do embrião pode ser modificado com sequências do operador TET.

Outro exemplo de um sistema que pode ser utilizado para identificar haplóides cedo no desenvolvimento utiliza o sistema repressor lac (Ulmasov et al. (1997) Plant Mol Biol 35:417-424; Wilde et al. (1992) EMBO J 11:1251-1259). Este sistema baseado em repressor/operador é derivado do operon procariótico, operon lactose de *E. coli*. Esse sistema controla a atividade de um promotor colocando sequências do operador perto do sítio de início transcricional de um gene tal que essa expressão gênica do operon é inibida após a ligação da proteína repressora à sequência do operador cognato. No entanto, na presença de um agente indutor, a ligação do repressor ao seu operador é inibida, ativando assim o promotor e

permitindo a expressão gênica. No sistema lac, isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) é o agente indutor comumente utilizado, enquanto que a tetraciclina, e/ou doxicilina são agentes indutores comumente usados para o sistema tet. O repressor lac tem sido amplamente caracterizado. O repressor lac tem uma alta associação constante para o seu operador, e o IPTG reduz a afinidade do repressor para o operador em 300 vezes (Barkley & Bourgeois (1980) The Operon, Miller & Reznikoff, Eds., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 177-220), apenas repressão de 30 vezes tem sido relatada usando o repressor lactose (Ulmasov et al. (1997) Plant Mol Biol 35-417-424). O repressor lac do milho pode ser otimizado e o promotor utilizado para parar o desenvolvimento do embrião pode ser modificado com sequências do operador lac.

O silenciamento de gene também pode ser utilizado na ablação seletiva de sistema de embriões diplóides. A repressão da letalidade do embrião pode estar no RNA ou no estágio de proteína, por exemplo, RNA anti-senso, grampos "hairpins", e outros mecanismos de silenciamento de genes. Por exemplo, poderia ter o polinucleotídeo com grampo "hairpin" de barnase impulsionado por um forte promotor, como o UBI. Este constructo compreendendo a alça pode estar ligado a um constructo que não permite a fertilização do pólen. O outro constructo poderia incluir o polinucleotídeo de barnase impulsionado pelo promotor lec1. Isso efetivamente desligaria barnase até o locus do grampo ser segregado para longe. Qualquer polinucleotídeo

que impede o desenvolvimento normal do embrião juntamente com um gene correspondente de silenciamento de constructo pode ser utilizado no sistema.

- 5 Exemplos de genes que podem ser conduzidos por um promotor de pólen e utilizados para impedir o pólen fértil na invenção incluem DAM (GenBank J01600, Nucleic Acids Res. 11: 837-851 (1983), alfa-amilase (GenBank L25805, Plant Physiol. 105 (2): 759-760 (1994)); D8
10 (Physiol. Plant 100 (3): 550-560 (1997)); SacB (Plant Physiol. 110 (2): 355-363 (1996)), lipases e ribonucleases; tasselseed2 (ts2) (Calderon-Urrea M. e S.L. Dellaporta (1999) Development 126: 435-441); toxina difteria A (DTA) (Greenfield et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 6853 (1983); Palmiter et al., Cell 50: 435
15 (1987)).

- Exemplos de promotores pólen-específicos que podem ser usados incluem mas não estão limitados a PG47 (Rogers et al. (1991), Pollen specific cDNA clones from Zea mays, Biochem. Biophys. Acta 1089, 411-413.; Allen, R.L., e Lonsdale, D.M. (1992) Sequence analysis of three members of the maize polygalacturonase gene family expressed during pollen development, Plant Mol. Biol. 20, 343-345,
20 Allen, R.L., e Lonsdale, D.M. (1993), Molecular characterization of one of the maize polygalacturonase gene family members which are expressed during late pollen development. The Plant Journal 3, 261-271, Patente US 5.412.085 e Patente US 5.545.546); gene pólen-específico do milho Zm13 (Hamilton et al. (1992) Plant
25
30

Mol. Biol. 18:211-218; Guerrero et al. (1993) Mol. Gen. Genet. 224: 161-168); promotores microsporo-específicos, como o gene promotor apg (Twell et al., Sex. Plant Reprod. 6: 217-224 (1993)); além disso, inclui um gene de pólen-expresso do girassol, SF3 (Baltz et al. (1992) The Plant Journal 2: 713-721), genes específicos do pólen de *B. napus* (Arnoldo et al. (1992) J. Cell. Biochem, Abstract No. Y101204). Esses promotores são conhecidos na arte ou podem ser descobertos por técnicas conhecidas; ver, por exemplo, Bhalla e Singh (1999) Molecular control of male fertility in Brassica Proc. 10th Annual Rapeseed Congress, Canberra, Australia; van Tunen et al. (1990) Pollen-specific chi promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene, Plant Cell 2: 393-40; Jeon et al. (1999); e Twell et al. (1993) Activation and developmental regulation of an Arabidopsis anther-specific promoter in microspores and pollen of *Nicotiana tabacum*, Sex. Plant Reprod. 6: 217-224.

Muitos exemplos de promotores de pólen e os polinucleotídeos utilizados com eles para evitar pólenes viáveis podem ser encontrados na Patente US 6.743.968 e na Publicação US 2005/0246796 (Pedido US No. 11/014.071).

Genes de cereal cujos promotores são associados à semente precoce e desenvolvimento embrionário incluem lecl (Patente US 7.122.658), glutelina de arroz ("GluA-3", Yoshihara e Takaiwa, 1996, Plant Cell Physiol 37: 107-11; "GluB-1", Takaiwa et al., 1996, Plant Mol Biol 30: 1207-21; Washida et al., 1999, Plant Mol Biol 40: 1-

12; "GT3", Leisy et al., 1990, Plant Mol Biol 14:41-50),
 prolamina de arroz (Zhou & Fan, 1993, Transgenic Res
 2:141-6), prolamina de trigo (Hammond-Kosack et al.,
 1993, EMBO J 12: 545-54), milho zein (Z4, Matzke et al .
 5 de 1990, Plant Mol Biol 14:323-32), e cevada B-hordeiis
 (Entwistle et al., 1991, Plant Mol Biol 17:1217-31).
 Promotores "preferidos de semente" incluem tanto os
 promotores "sementes-específicos" (os promotores ativos
 durante desenvolvimento da semente, tais como promotores
 10 das proteínas do armazenamento de sementes), bem como
 promotores "de germinação de sementes" (os promotores
 ativos durante a germinação das sementes). Ver Thompson
 et al. (1989) BioEssays 10: 108. Esses promotores
 preferidos de semente incluem, mas não estão limitados a,
 15 Cim1 (mensagem induzida por citocinina), cZ19B1 (milho 19
 kDa zein), milps (mio-inositol-1-fosfato sintase); ver WO
 00/11177 e Pat. US No. 6225529. Gamma-zein é um promotor
 endosperma-específico. Globulin-1 (Glob-1) é um promotor
 embrião-específico representante. O gene Glb1 do milho
 20 codifica globulina-1, uma proteína de grande
 armazenamento de embrião. (Kriz, AL, et al. (1986) Plant
 Physiol. 82: 1069-1075) Glb1 é expresso no
 desenvolvimento de sementes de milho durante o
 desenvolvimento embrionário. (Belanger, FC, et al. (1989)
 25 Plant Physiol . 91: 636-643). A região do promotor Glb1
 foi identificada, clonada, e introduzida em plantas de
 tabaco por transformação mediada por Agrobacterium. (Liu,
 S., et al. (1996) Plant Cell Reports 16:158-162) As
 plantas transformadas demonstraram que o promotor Glb1
 30 tem desejável especificidade temporal e de tecidos. O

promotor Glb1 é regulado positivamente por ácido
 abscísico (ABA). (Kriz, A.L., et al. (1990) *Plant*
Physiol. 92: 538-542; Paiva, R., et al., (1994) *Planta*
 192: 332-339) Níveis de hormônio vegetal ABA são
 5 conhecidos por oscilar em condições de frio ou dessecação
 (Himmelbach, A., et al. (1998) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*
 353: 1439 - 1444). Assim, a atividade do promotor Glb1
 pode ser diferentemente afetada. De dicotiledôneas,
 promotores específicos de sementes incluem, mas não estão
 10 limitados a, β -phaseolina de feijão, napin, β -
 conglucina, lecitina de soja, cruciferina, e coisas do
 gênero. Mais exemplos de promotores específicos de
 sementes de monocotiledôneas incluem, mas não estão
 limitados a, milho zein 15 kDa, zein 22 kDa; zein 27 kDa
 15 (Boronat, A., Martinez, M.C., Reina, M., Puigdomenech, P.
 e Palau, J.R.; Isolation and sequencing of a 28 kD
 glutelin-2 gene from maize: Common elements in the 5'
 flanking regions among zein and glutelin genes; *Plant*
Sci. 47: 95-102 (1986)); gamma-zein; ceroso (Kloesgen,
 20 R.B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z.S. e Saedler, H.,
 Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays*, *Mol.*
Gen. Genet. 203: 237-244 (1986)); shrunken 1; shrunken 2
 (Shaw et al., *Plant Phys* 98:1214-1216, 1992; Zhong Chen
 et al., *PNAS USA* 100: 3525-3530, 2003); globulina 1;
 25 mZE40-2, também conhecido como Zm-40, Patente US
 6.403.862; um promotor ltp2 (Kalla, et al., *Plant Journal*
 6: 849-860 (1994); Pat. US nº 5525716), promotor cim1
 (ver Pat. US No. 6,225,529); nuclc (Pat. US nº 6407315);
 etc. Ver também WO 00/12733 e Pat. US No. 6.528,704, onde
 30 os promotores preferidos de sementes de genes end1 e end2

são divulgados. Promotores específicos de embrião adicionais são divulgados em Sato et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8117-8122 (arroz homeobox, OSH1); e Postma-Haarsma et al. (1999) Plant Mol. Biol. 39: 257-71 (genes arroz KNOX). Promotores endosperma-específicos adicionais são divulgados em Albani et al. (1984) EMBO 3: 1405-15; Albani et al. (1999) Theor. Appl. Gen. 98: 1253-62; Albani et al. (1993) Plant J. 4: 343-55; Mena et al. (1998) The Plant Journal 116: 53-62 (cevada DOF); Opsahl-Ferstad et al. (1997) Plant J 12: 235-46 (milho ESR) e Wu et al. (1998) Plant Cell Physiology 39: 885-889 (GluA-3 de arroz, GluB-1, NRP33, RAG-1).

Exemplos de promotores constitutivos incluem o promotor 1'- ou 2'- de *Agrobacterium tumefaciens* (ver, por exemplo, O'Grady (1995) Plant Mol. Biol. 29: 99-108). Outros promotores de planta incluem a pequena subunidade de promotor ribulose-1,3-difosfato-carboxilase, o promotor phaseolina, promotores de gene álcool desidrogenase (Adh) (ver, por exemplo, Millar (1996) Plant Mol. Biol. 31: 897-904), promotores de sintase de sacarose, promotores α -tubulina, promotores actina, como o promotor do gene da actina de *Arabidopsis* (ver, por exemplo, Huang (1997) Plant Mol. Biol. 1997 33: 125-139), cab, PEPCase, complexo do gene R, ACT11 de *Arabidopsis* (Huang et al. Plant Mol. Biol. 33: 125-139 (1996)), Cat3 de *Arabidopsis* (Zhong et al., Mol. Gen. Genet. 251: 196-203 (1996)), o gene que codifica a proteína transportadora stearoil-acil desaturase de *Brassica napus*

(Solocombe et al. (1994) *Plant Physiol.* 104: 1167-1176), GPC1 de milho (Martinez et al. (1989) *J. Mol. Biol.* 208: 551-565), GPC2 de milho (Manjunath et al. (1997), *Plant Mol. Biol.* 33: 97-112), e outras regiões de início de

5 transcrição de vários genes vegetais conhecidos na arte. Ver também Holtorf (1995) "*Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in Arabidopsis thaliana*," *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646. A sequência do promotor do

10 gene E8 (ver, Deikman e Fischer (1988) *EMBO J* 7: 3315) e de outros genes também podem ser utilizadas, juntamente com os promotores específicos para espécies de monocotiledôneas (por exemplo, McElroy D., et al. (1994) *Foreign gene expression in transgenic cereals*, *Trends*

15 *Biotech.* 12:62- 68). Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, o promotor nuclear do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos divulgados no WO 99/43838 e Pat. US No. 6072050; o promotor nuclear CaMV 35S (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); actina do

20 arroz (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 e Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730); promotor ALS (Pat. US n ° 5659026), e

25 similares. No entanto, outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, Pat. US N ° 5608149; 5,608,144; 5.604.121, 5.569.597, 5.466.785, 5399, 680; 5268, 463; 5608, 142; e 6177611.

Além dos promotores apresentados aqui, promotores de origem bacteriana que operam nas plantas podem ser usados na invenção. Eles incluem, por exemplo, o promotor octopina sintase, o promotor nopalina sintase e outros

5 promotores derivados de plasmídios Ti. Ver, Herrera-Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209. Promotores virais também podem ser utilizados. Exemplos de promotores virais incluem os promotores 35S e 19S do RNA do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Ver, Odell et al., (1985)

10 *Nature* 313:810; e, Dagless (1997) *Arch. Virol.* 142: 183-191. Outros exemplos de promotores constitutivos de vírus que infectam plantas incluem o promotor do vírus do mosaico do tabaco; vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) promotores 19S e 35S ou o promotor do vírus do mosaico da

15 escrofulária, por exemplo, o promotor 35S do vírus do mosaico da escrofulária (ver, por exemplo, Maiti (1997) *Transgenic Res.* 6: 143-156), etc. Alternativamente, novos promotores com características úteis podem ser identificados a partir de qualquer vírus, bactéria, ou

20 fonte vegetal através de métodos, incluindo a análise de sequência, captura de potenciador ou promotor, e similares conhecidos no estado da técnica.

Promotores tecido-preferidos (tecido-específico) e

25 potenciadores podem ser utilizados para reforço da expressão do gene alvo dentro de um determinado tecido vegetal. Promotores tecido-preferidos (tecido-específico) incluem, por exemplo, os descritos em Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12 (2): 255-265; Kawamata et al. (1997)

30 *Plant Cell Physiol.* 38 (7): 792-803; Hansen et al. (1997)

Mol. Gen Genet. 254 (3): 337-343, Russell et al. (1997)
 Transgenic Res. 6 (2): 157-168; Rinehart et al. (1996)
 Plant Physiol. 112 (3): 1331-1341; Van Camp et al. (1996)
 Plant Physiol. 112 (2): 525-535; Canevascini et al.
 5 (1996) Plant Physiol. 112 (2): 513-524, Yamamoto et al.
 (1994) Plant Cell Physiol. 35 (5): 773-778; Lam (1994)
 Results Probl. Cell Differ. 20:181-196; Orozco et al.
 (1993) Plant Mol Biol. 23 (6): 1129-1138; Matsuoka et al.
 (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90 (20): 9586-9590; e
 10 Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J. 4 (3): 495-505.
 Tais promotores podem ser modificados, se necessário,
 para a expressão mais fraca ou expressão mais forte. Um
 promotor tecido-específico pode dirigir a expressão de
 sequências encadeadas operacionalmente em tecidos que não
 15 o tecido-alvo. Assim, tal como utilizado aqui, um
 promotor específico de tecidos é um que dirige a
 expressão preferencialmente no tecido-alvo, mas também
 pode levar a alguma expressão em outros tecidos também.

20 Em certos experimentos, promotores específicos de
 senescência podem ser utilizados, por exemplo, piruvato,
 promotor ortofosfato diquinase (PPDK) de plantas C4
 (milho), promotor de milho cab-M1 Ca²⁺, promotor do gene
 relacionado com *Arabidopsis thaliana* myb (Atmyb5), o
 25 promotor ribulose-difosfato-carboxilase (RBCS) (por
 exemplo, os genes do tomate RBCS1, RBCS2 e RBCS3A, que
 são expressos em folhas e mudas cultivadas, enquanto
 RBCS1 e RBCS2 são expressos em desenvolvimento de frutos
 de tomate, e/ou um promotor ribulose-difosfato-
 30 carboxilase que é expresso quase exclusivamente em

células mesófilas em lâminas e bainhas foliares em níveis elevados, etc), e coisas do gênero. Ver, por exemplo, Matsuoka et al., (1993) *Tissue-specific light-regulated expression directed by the promoter of a C4 gene, maize pyruvate, orthophosphate dikinase, in a C3 plant, rice*, *PNAS USA* 90(20): 9586-90; (2000) *Plant Cell Physiol.* 41 (1): 42-48; (2001) *Plant Mol. Biol.* 45 (1): 1-15; Shiina, T. et al., (1997) *Identification of Promoter Elements involved in the cytosolic Ca²⁺ mediated photoregulation of maize cab- m1 expression*, *Plant Physiol.* 115: 477-483; Casal (1998) *Plant Physiol.* 116: 1533-1538; Li (1996) *FEBS Lett.* 379: 117-121; Busk (1997) *Plant J.* 11: 1285-1295, e Meier (1997) *FEBS Lett.* 415: 91-95, e Matsuoka (1994) *Plant J.* 6: 311-319. Outros promotores folha-específicos incluem, por exemplo, Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12 (2): 255-265; Kwon et al. (1994) *Plant Physiol.* 105: 357-67; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35 (5): 773-778; Gotor et al. (1993) *Plant J.* 3: 509-18; Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23 (6): 1129-1138; e Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (20): 9586-9590.

Em certos procedimentos, promotores específicos de senescência podem ser utilizados (por exemplo, um promotor ativo do tomate durante a maturação do fruto, senescência e abscisão de folhas, um promotor do gene do milho que codifica para uma cisteína protease, e similares). Ver, por exemplo, Blume (1997) *Plant J.* 12: 731-746; Griffiths et al., (1997) *Sequencing, expression pattern and RFLP mapping of a senescence-enhanced cDNA*

- from *Zea Mays* with high homology to oryzain gamma and aleurain, *Plant Mol. Biol.* 34 (5): 815-21; gene seel parcial de *Zea mays* para protease cisteína, região promotora e região codificadora 5', GenBank AJ494982;
- 5 Kleber-Janke, T. e Krupinska, K. (1997) *Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark- induced senescence as well as during senescence under field conditions*, *Planta* 203 (3):332-40, e Lee, R.H. et al., (2001) *Leaf senescence in rice*
- 10 *plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes*, *J. Exp. Bot.* 52 (358): 1117-21.

Promotores raízes-preferidos são conhecidos e podem ser selecionados dentre muitos disponíveis na literatura

15 ou isolados a partir de várias espécies compatíveis. Ver, por exemplo, Hire et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20 (2): 207-218 (gene específico da raiz de soja glutamina sintetase), Keller e Baumgartner (1991) *Plant Cell* 3 (10): 1051-1061 (gene raiz-específico elemento de

20 controle no GRP 1.8 do feijão); Sanger et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14 (3): 433-443 (promotor raiz-específico do gene mannopine sintase (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens*) e Miao et al. (1991) *Plant Cell* 3 (1): 11-22 (clone de cDNA de comprimento total

25 codificando glutamina sintetase citosólica (GS), que se expressa nas raízes e nódulos da raiz da soja). Veja também Bogusz et al. (1990) *Plant Cell* 2 (7): 633-641, onde dois promotores raízes-específicos isolados de genes da hemoglobina da fixação de nitrogênio da não leguminosa

30 *Parasponia andersonii* e as não leguminosas sem fixação de

nitrogênio relacionadas *Trema tomentosa* são descritos. Os promotores destes genes foram ligados a um gene repórter β -glucuronidase e introduzidos em ambas a não leguminosa *Nicotiana tabacum* e a leguminosa *Lotus corniculatus*, e em
5 ambos os casos a atividade de promotor específico de raiz foi preservada. Leach e Aoyagi (1991) descrevem a sua análise dos promotores dos genes altamente expressos rolC e rolD de indução de raiz de *Agrobacterium rhizogenes* (ver *Plant Science* (Limerick) 79 (1): 69-76). Eles
10 concluíram que o potenciador e determinantes de DNA tecido-específicos são dissociados nesses promotores. Teeri et al. (1989) utilizou a fusão do gene lacZ para mostrar que o gene T-DNA de *Agrobacterium* que codifica octopina sintase é especialmente ativo na epiderme da
15 ponta da raiz e que o gene TR2' é raiz específico na planta intacta e estimulado por ferimento no tecido foliar (ver, por exemplo, *EMBO J.* 8 (2): 343-350). O gene TR1', fundido a nptII (neomicina-fosfotransferase II) apresentou características semelhantes. Promotores
20 raízes-preferidos adicionais incluem o gene promotor VfENOD-GRP3 (Kuster et al. (1995) *Plant Mol. Biol.* 29 (4): 759-772); e promotor rolB (Capana et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 25. (4): 681-691. Ver também, Pat. US nº 5.837.876, 5.750.386, 5.633.363, 5.459.252, 5.401.836;
25 5,110732 e 5023179.

O uso de promotores que agem temporalmente também é contemplado por esta invenção. Por exemplo, promotores que atuam 0-25 dias após a polinização (DAP), 4-21, 4-12,
30 ou 8-12 DAP podem ser selecionados, por exemplo,

promotores, como *cim1* e *ltp2*. Promotores que atuam 0-14 dias após a polinização podem também ser utilizados, tais como SAG12 (Ver WO 96/29858, Richard M. Amasino, publicado em 3 Out. 1996) e ZAG1 ou ZAG2 (Ver R.J. Schmidt, et al., *Identification and Molecular Characterization of ZAG1, the Maize Homolog of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene AGAMOUS*, Plant Cell-5 (7): 729-37 (Julho 1993)). Outros promotores úteis incluem o *zag2. 1*, Zap do milho (também conhecido como ZmMADS; Pedido de Patente US N. º 10/387,937; WO 03/078590), e do promotor do milho *tb1* (ver também Hubbarda et al. Genetics 162: 1927-1935, 2002).

Promotores broto-preferidos incluem, promotores broto do meristema-preferidos, tais como promotores divulgados em Weigal et al. (1992) Cell 69: 853-859; Acesso No. AJ131822; Acesso No. Z71981; Acesso No. AF059870, o promotor ZAP (Pedido de patente US N. º 10/387,937), o promotor do milho (Wang et al. (1999) Nature 398: 236-239, e promotores broto-preferidos divulgados em Mc Avoy et al. (2003) Acta Hort. (ISHS) 625: 379-385.

Um promotor induzível é um promotor que é capaz de, direta ou indiretamente, ativar a transcrição de uma ou mais sequências de DNA ou genes em resposta a um indutor. Na ausência de um indutor, as sequências de DNA ou genes não serão transcritos, ou serão transcritos em um nível inferior ao de um estado induzido. O indutor pode ser um agente químico, como um metabólito, regulador do

crescimento, herbicida ou composto fenólico, ou um estresse fisiológico diretamente imposto à planta, tais como frio, seca, calor, sal, toxinas. Promotores de plantas que são induzíveis após exposição a hormônios vegetais, tais como auxinas, podem ser utilizados. Por exemplo, a invenção pode utilizar os elementos de resposta a auxina do promotor subsequente E1 (AuxREs) a partir da soja (*Glycine max* L.) (Liu (1997) *Plant Physiol.* 115: 397-407), o promotor auxina-responsivo de *Arabidopsis* GST6 (também responsivo ao ácido salicílico e peróxido de hidrogênio) (Chen (1996) *Plant J.* 10: 955-966), o promotor auxina-induzível parC do tabaco; um elemento resposta da biotina vegetal (Streit (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 933-937) e o promotor responsivo ao estresse do hormônio ácido abscísico (Sheen (1996) *Science* 274: 1900-1902). Promotores vegetais que são induzíveis após exposição a reagentes químicos que podem ser aplicados às plantas, como herbicidas ou antibióticos, também são usados para expressar polinucleotídeos. O promotor pode ser um produto químico-promotor induzível, quando a aplicação do produto químico induz a expressão gênica, ou um promotor químico-repressivo, em que a aplicação do produto químico reprime a expressão gênica. Por exemplo, o promotor IN2-2 do milho, ativado por herbicida protetor benzenossulfonamida, pode ser utilizado (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38: 568-577); aplicação de diferentes herbicidas protetores induz distintos padrões de expressão gênica, incluindo a expressão na raiz, hidatódios e no meristema apical do broto. Uma sequência

de codificação ACC sintase ou configuração de RNA também pode estar sob o controle de, por exemplo, promotores tetraciclina-induzível e tetraciclina-repressível (ver, por exemplo, Gatz et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237; Pat. US n ° 5814618 e 5789156, e, Masgrau (1997) Plant J. 11: 465-473 (descrevendo plantas de tabaco transgênicas contendo o gene arginina descarboxilase da *Avena sativa* L. (aveia) com um promotor tetraciclina-induzível); ou, um elemento ácido salicílico-responsivo (Strange (1997) Plant J. 11: 1315-1324. Outros promotores químico-induzíveis são conhecidos na arte e incluem, mas não estão limitados a, o promotor GST do milho, que é ativado por compostos hidrofóbicos electrofílicos que são usados como herbicidas pré-emergentes, e o promotor PR-1a do tabaco, que é ativado pelo ácido salicílico. Outras promotores químico-reguladores de interesse incluem promotores esteróide-responsivos (ver, por exemplo, o promotor glicocorticóide-induzível em Schena et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10421-10425 e McNellis et al. (1998) Plant J. 14 (2): 247-257).

Exemplos de elementos reguladores induzíveis incluem um elemento regulador metalotioneína, um elemento regulador cobre-induzível, ou um elemento regulador tetraciclina-induzível, a transcrição a partir da qual pode ser efetuada em resposta a íons de metal divalentes, cobre ou tetraciclina, respectivamente (Fürst et al., Cell 55: 705-717, 1988; Mett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4567-4571, 1993; Gatz et al., Plant J. 2: 397-404, 1992; Roder et al., Mol. Gen. Genet. 243: 32-38,

1994). Elementos reguladores induzíveis incluem também um elemento regulador ecdisona ou um elemento regulador glicocorticóide, a transcrição a partir da qual pode ser efetuada em resposta a ecdisona ou outros esteróides

5 (Christopherson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6314-6318, 1992; Schena et al., Proc. Natl. Sci. USA 88: 10421-10425, 1991; Pat. US nº 6504082); um elemento regulador responsivo ao frio ou um elemento regulador de choque térmico, a transcrição a partir da qual pode ser

10 efetuada em resposta à exposição ao frio ou calor, respectivamente (Takahashi et al., Plant Physiol. 99: 383-390, 1992), o promotor do gene da álcool-desidrogenase (Gerlach et al. PNAS USA 79: 2981-2985 (1982), Walker et al., PNAS 84 (19): 6624-6628 (1987)),

15 induzido por condições anaeróbicas, e o promotor luz-induzível derivado do gene RBCS da ervilha ou gene psadb da ervilha (Yamamoto et al. (1997) Plant J. 12 (2): 255-265), um elemento regulador luz-induzível (Feinbaum et al., Mol. Gen. Genet. 226: 449, 1991; Lam e Chua, Science

20 248: 471, 1990; Matsuoka et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (20): 9586-9590; Orozco et al. (1993) Plant Mol. Bio. 23 (6): 1129-1138), um elemento regulador hormônio vegetal-induzível (Yamaguchi-Shinozaki et al., Plant Mol. Biol. 15: 905, 1990; Kares et al., Plant Mol.

25 Biol. 15: 225, 1990), e similares. Um elemento regulador induzível também pode ser o promotor do gene do milho In2-1 ou In2-2 que responde ao herbicida de proteção benzenossulfonamida (Hershey et al., Mol. Gen. Gene 227: 229-237, 1991; Gatz et al. Mol. Gen. Genet. 243: 32-38,

30 1994), e do repressor Tet do transposon Tn10 (Gatz et

al., Mol. Gen. Genet. 227: 229-237, 1991). Promotores stress-induzíveis incluem promotores sal/estresse hídrico-induzíveis, como P5CS (Zang et al. (1997) Plant Sciences 129: 81-89); promotores frio-induzíveis, tais como, cor15a (Hajela et al. (1990) Plant Physiol. 93: 1246-1252), cor15b (Wlhelm et al. (1993) Plant Mol Biol 23: 1073-1077), wsc120 (Ouellet et al. (1998) FEBS Lett. 423-324-328), ci7 (Kirch et al. (1997) Plant Mol Biol. 33: 897-909), ci21A (Schneider et al. (1997) Plant Physiol. 113: 335-45); promotores seca-induzíveis, tais como, Trg-31 (Chaudhary et al. (1996) Plant Mol. Biol. 30: 1247-57), rd29 (Kasuga et al. (1999) Nature Biotechnology 18: 287-291); promotores osmóticos induzíveis, tais como Rab17 (Vilardell et al. (1991) Plant Mol. Biol. 17: 985-93) e osmotina (Raghothama et al. (1993) Plant Mol Biol 23: 1117-28); e promotores calor induzíveis, tais como proteínas de choque térmico (Barros et al. (1992) Plant Mol. 19: 665-75; Marrs et al. (1993) Dev. Genet. 14: 2741), smHSP (Waters et al. (1996) J. Experimental Botany 47: 325-338), e o elemento choque térmico induzível do promotor da ubiquitina da salsa (WO 03/102198). Outros promotores stress-induzíveis incluem rip2 (Pat. US No. 5332808 e Publicação US No. 2003/0217393) e rd29a (Yamaguchi-Shinozaki et al. (1993) Mol. Gen. Genetics 236: 331-340). Alguns promotores são induzíveis por ferimento, incluindo o promotor pmas de Agrobacterium (Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J. 4 (3): 495-505) e o promotor ORF13 de Agrobacterium (Hansen et al., (1997) Mol. Gen. Genet. 254 (3): 337-343).

O cassete de expressão utilizado na invenção pode incluir, o término 3' da sequência nucleotídica heteróloga de interesse, uma região de terminação transcricional e traducional funcional em plantas. A
5 região de terminação pode ser nativa com a sequência nucleotídica do promotor da presente invenção, pode ser nativa com a sequência de DNA de interesse, ou pode ser derivada de outra fonte. Regiões de terminação convenientes estão disponíveis a partir do plasmídeo Ti
10 de *A. tumefaciens*, tais como as regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. O término 3' de *pinII* (inibidor de proteinase da batata) pode ser utilizado. Ver Ryan (1990) Ann. Rev. Phytopath. 28: 425-449; Duan et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 494-498.
15 Para as outras sequências 3' terminais ver também, Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64: 671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5: 141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2: 1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91: 151-158; Ballas
20 et al. 1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891-7903; Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627-9639.

Os cassetes de expressão podem conter adicionalmente sequências condutoras 5'. Tais sequências condutoras
25 podem atuar para melhorar a tradução. Condutores de tradução são conhecidos na arte e incluem: condutores de picornavírus, por exemplo, condutor EMCV (região não codificadora 5' da encefalomiocardite), Elroy-Stein et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6126-6130;
30 condutor do potyvírus, por exemplo, condutor do TEV

(Tobacco Etch Virus), Allison et al. (1986); condutor do MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus), Virology 154: 9-20; proteína de ligação de cadeia pesada da imunoglobulina humana (BIP), Macejak et al. (1991) *Nature* 353: 90-94; 5 condutor não traduzido da proteína capsidial do mRNA do vírus do mosaico da alfalfa (AMV RNA 4), Jobling et al. (1987) *Nature* 325: 622-625), condutor do vírus do mosaico do tabaco (TMV), Gallie et al. (1989) *Molecular Biology of RNA*, páginas 237-256; e condutor do maize chlorotic 10 mottle virus (MCMV) Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382-385. Ver também Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiology* 84: 965-968. O cassete pode conter também sequências que realçam a tradução e/ou a estabilidade do mRNA, como íntrons.

15

Qualquer tipo de transformação pode ser utilizado para obter a linha indutora de ablação seletiva. Protocolos de transformação, bem como protocolos para a introdução de sequências nucleotídicas em plantas podem 20 variar dependendo do tipo de planta ou de células vegetais, ou seja, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, orientadas para a transformação. Os métodos de introdução de sequências nucleotídicas em células vegetais e posterior inserção no genoma vegetal incluem microinjeção 25 (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4: 320-334), eletroporação (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5602-5606, transformação mediada por *Agrobacterium* (Townsend et al., Pat US No. 5563055), a transferência direta de genes (Paszkowski et al. (1984) 30 *EMBO J.* 3: 2717-2722), e aceleração de partículas

balísticas (ver, por exemplo, Sanford et al., Patent US No. 4945050; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," em *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg e Phillips (Springer-Verlag, Berlim) e McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6: 923-926). Ver também Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5: 27-37 (cebola); Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87: 671-674 (soja); McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 923-926 (soja); Finer e McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27p: 175-182 (soja), Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 319-324 (soja); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740 (arroz), Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4305-4309 (milho), Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6: 559-563 (milho); Tomes, Patente US No. 5.240.855; Buising et al., Patente US nº 5322783 e 5324646; Tomes et al. (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (milho), Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91: 440-444 (milho); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8: 833-839 (milho); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311: 763-764; Bowen et al., Patente US No. 5.736.369 (cereais); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl.. Acad. Sci. USA* 84: 5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) em *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (pólen); Kaeppler et al.

(1990) *Plant Cell Reports* 9: 415-418 e Kaeppler et al.
 (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566 (transformação
 mediada por verga da cevadeira); D'Halluin et al. (1992)
Plant Cell 4: 1495-1505 (eletroporação), Li et al. (1993)
 5 *Plant Cell Reports* 12: 250-255 e Christou e Ford (1995)
Annals of Botany 75: 407-413 (arroz); Ishida et al.
 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 745-750; Patente US
 5.731.179; US 5.591.616; US 5.641.664; e US 5.981.840
 (milho via *Agrobacterium tumefaciens*), as divulgações são
 10 incorporadas aqui por referência.

Na planta a transformação por *Agrobacterium* é
 divulgada nos seguintes: Bechtold, N., J. Ellis, G.
 Pelletier (1993) *C.R., Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1194-
 15 1199; Bechtold, N., B. et al. (2000) *Genetics* 155: 1875-
 1887; Bechtold, N. e G. Pelletier (1998) *Methods Mol*
Biol. 82: 259-266; Chowrira, G.M., V. Akella, Lurquin e
 P.F. (1995) *Mol. Biotechnol.* 3: 17-23; Clough, S.J., e
 A.F. Bent (1998) *Plant J.* 16: 735-743; Desfeux, C., S.J.
 20 Clough, e A.F. Bent. (2000) *Plant Physiol.* 123: 895-904;
 Feldmann, K.A., e M.D. Marks (1987) *Mol. Gen. Genet.* 208:
 1-9; Hu C.-Y., e L. Wang. (1999) *Em Vitro Cell Dev.*
Biol.-Plant 35: 417-420; Katavic, VGW Haughn, D. Reed, M.
 Martin, L. Kunst (1994) *Mol. Gen. Genet.* 245: 363-370;
 25 Liu, F., et al. (1998) *Acta Hort* 467: 187-192; Mysore,
 K.S., C.T. Kumar, e S.B. Gelvin (2000) *Plant J.* 21: 9-16;
 Touraev, A., E. Stoger, V. Voronin, e E. Heberle-Bors
 (1997) *Plant J.* 12: 949-956; Trieu, A.T. et al. (2000)
Plant J. 22: 531-541; Ye, G. N. et al. (1999) *Plant J.*
 30 19: 249-257; Zhang, J.U. et al. (2000) *Chem Biol.* 7: 611-

621. As divulgações acima são aqui incorporadas por referência.

Vários tipos de tecidos vegetais podem ser
5 utilizados para transformação, tais como células
embrionárias, células meristemáticas, células foliares,
calos ou células derivadas de embriões, folhas ou células
meristemáticas. No entanto, qualquer célula competente em
transformação ou tecido pode ser utilizada. Vários
10 métodos para aumentar a frequência de transformação
também podem ser empregados. Tais métodos são divulgados
em WO 99/61619, WO 00/17364, WO 00/28058, WO 00/37645; US
Nº 09/496,444; WO 00/50614; US 01/44038 e WO 02/04649. As
divulgações acima são aqui incorporadas por referência.

15

Transformação de milho pode seguir um protocolo de
transformação por bombardeamento bem estabelecido
utilizado para a introdução de DNA em escutelos de
embriões imaturos de milho (ver, por exemplo, Tomes et
20 al. Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via
Microprojectile Bombardment. pp.197-213, em Plant Cell,
Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods. eds. O.L.
Gamborg e G.C. Phillips. Springer-Verlag Berlin
Heidelberg New York, 1995.). As células são transformadas
25 pelo cultivo de embriões imaturos de milho
(aproximadamente 1-1,5 milímetros de comprimento) em meio
contendo sais N6, vitaminas Eriksson's, 0,69 g/L de
prolina, 2 mg/L de 2,4-D e 3% de sacarose. Após 4-5 dias
de incubação no escuro a 28°C, os embriões são eliminados
30 do primeiro meio e cultivados em meio similar contendo

12% de sacarose. Os embriões são aclimatizados neste meio para 3 h antes da transformação. A superfície escutelar dos embriões imaturos é segmentada usando bombardeamento de partículas. Embriões são transformados utilizando a
5 arma de hélio Gun PDS-1000 da Bio-Rad em um tiro por amostra utilizando discos de ruptura de 650PSI. A descarga de DNA por tiro chega a 0.1667µg. Após bombardeio, todos os embriões são mantidos em meio de cultura de milho normal (sais N6, vitaminas Eriksson's,
10 0,69g/L de prolina, 2mg/L de 2,4-D, 3% de sacarose) por 2-3 dias e depois transferidos para meio baseado em N6 contendo um agente seletivo. Placas são mantidas a 28°C no escuro e são observadas para recuperação de colônia com transferências para meio fresco de duas a três
15 semanas. Colônias recuperadas e plantas são pontuadas baseado no fenótipo selecionável ou telado transmitidos pelo gene marcador (s) introduzido (ou seja, resistência a herbicida, fluorescência ou produção de antocianina), e pela caracterização molecular através de PCR e análise de
20 Southern.

Transformação de milho também pode ser feita usando o método de descarga de DNA mediada por *Agrobacterium*, tal como descrito pela Patente dos Estados Unidos n.
25 5981840, com as seguintes modificações. Agrobacterias são cultivadas para a fase log em meio líquido mínimo A contendo 100µM de espectinomicina. Os embriões são imersos em uma fase log de suspensão de Agrobacteria ajustada para obter uma concentração efetiva de 5×10^8
30 cfu/mL. Embriões são infectados por 5 minutos e em

seguida co-cultivados em meio contendo acetosiringona durante 7 dias a 20°C no escuro. Após 7 dias, os embriões são transferidos para o meio padrão da cultura (saís MS com macronutrientes N6, 1mg/L de 2,4-D, 1mg/L de Dicamba, 20g/L de sacarose, 0.6g/L de glucose, 1mg/L de nitrato de prata, e 100mg/L de carbenicilina), com um agente seletivo. Placas são mantidas a 28°C no escuro e são observadas para recuperação da colônia com transferências para meio fresco duas a três semanas. Colônias recuperadas e plantas são pontuadas baseado no fenótipo selecionável ou telado transmitido pelo gene marcador (s) introduzido (ou seja, resistência a herbicida, fluorescência ou produção de antocianina), e pela caracterização molecular através de PCR e análise de Southern.

Um marcador selecionável pode ser utilizado na recuperação de células transformadas. Genes marcadores incluem genes que codificam a resistência aos antibióticos, tais como a codificação de neomicina-fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT), bem como genes de resistência a compostos herbicidas, tais como o glufosinato de amônio (o ingrediente ativo em BASTATM), bromoxinil, imidazolinonas, e 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Por exemplo, um polinucleotídeo com resistência a herbicida que codifica glifosato N-acetiltransferase (GAT) poderia ser utilizado com o agente selecionável glifosato. Ver publicação PCT WO 02/36782 e Pedido US No. 10/427,692. O polinucleotídeo PAT (fosfinotricina acetiltransferase) poderia ser

utilizado para a resistência à fosfinotricina (DeBlock et al., 1987, Engineering herbicide resistance in plant by expression of a detoxifying enzyme, *EMBO J.* 6: 2513-2518). Outro exemplo é um polinucleotídeo ALS (acetolactato sintase) de resistência à imidazolinas (Sathasivan et al., 1990, Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var, Columbia, *Nucleic Acids Res.* 18:2188). Marcadores selecionáveis adicionais incluem marcadores fenotípicos tais como β -galactosidase e proteínas fluorescentes, como a proteína verde fluorescente (GFP) (Su et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 85: 610-9 e Fetter et al. (2004) *Plant Cell* 16: 215-28), proteína fluorescente cian (CYP) (Bolte et al. (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54 e Kato et al. (2002) *Plant Physiol* 129: 913-42), e proteína fluorescente amarela (PhiYFPTM de Evrogen, ver, Bolte et al. (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54). Para obter mais marcadores selecionáveis, ver geralmente, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley et al. (1980) em *The Operon*, pp. 177-220; Hu et al. (1987) *Cell* 48:555-566, Brown et al. (1987) *Cell* 49:603-612; Figge et al. (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; et al Deuschle. (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Tese de Doutorado, Universidade de Heidelberg; Reines et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 90:1917-1921; Labow et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Baim et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653, Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162; Degenkolb et al. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother* 35:1591-1595; Kleinschmidt et al. (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin (1993) Tese de Doutorado, Universidade de Heidelberg; Gossen et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva et al. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka et al. (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin), Gill et al. (1988) *Nature* 334:721-724. Tais divulgações são aqui incorporadas por referência. Esta lista de genes marcadores selecionáveis não pretende ser uma limitação. Qualquer gene marcador selecionável pode ser utilizado na presente invenção.

20 Após embriões haplóides terem identificado as células haplóides, embriões haplóides, sementes haplóides, mudas haplóides ou plantas haplóides podem ser tratados com um agente de duplicação de cromossomo. Plantas homozigóticas podem ser regeneradas a partir de
 25 células haplóides, contactando células haplóides, como células de embrião haplóides, com agentes de duplicação cromossômica. As células haplóides podem entrar em contato com o agente de duplicação no momento da polinização, no momento após a polinização, tipicamente 6
 30 horas a 21 dias após a polinização, 6 horas a 15 dias

após a polinização, na fase de semente madura, na fase de mudas, ou na fase de planta. O embrião haplóide pode entrar em contato com o agente de duplicação quando um núcleo espermático de um grão de pólen funde com os

5 núcleos polares no saco embrionário para criar um endosperma triplóide (3N) (quando o embrião haplóide é formado), no momento após a polinização, normalmente 6 horas a 21 dias após a polinização, 6 horas a 15 dias após a polinização, ou na fase de semente madura. O

10 embrião haplóide pode ser isolado. Ele pode ser contido dentro do núcleo, óvulo, ou semente. Também pode ser sobre a espiga, no caso do milho, ou no espigão, como no caso de outros grãos como o trigo. A espiga compreendendo o embrião haplóide pode ser na planta ou isolada da

15 planta. A espiga também pode ser seccionada. Após a duplicação cromossômica, o embrião haplóide duplo vai conter 2 cópias maternalmente derivadas de cromossomos. A eficiência do processo de obtenção de plantas haplóides duplicadas de embriões haplóides pode ser superior a 10%,

20 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%.

Métodos de duplicação cromossômica são divulgados 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

25 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 divulgações são incorporadas neste documento por referência. Métodos típicos envolvem contato com as células com colchicina, agentes anti-

30 microtúbulos ou herbicidas anti-microtúbulos, pronamida,

óxido nitroso, ou qualquer inibidor mitótico para criar células haplóides duplicadas homozigóticas. A quantidade de colchicina utilizada é geralmente em média 0,01% - 0,2% ou cerca de 0,05% ou APM (5-225µM). A quantidade de pronamida no meio é de aproximadamente 0,5-20µM. Exemplos de inibidores mitóticos conhecidos são incluídos, mas não estão limitados àqueles indicados na Tabela 5. Outros agentes podem ser utilizados com os inibidores mitóticos para melhorar a eficiência de duplicação. Esses agentes podem ser dimetilsulfóxido (DMSO), adjuvantes, surfactantes, e coisas do gênero.

TABELA 5

Nome comum/ Nome da marca	CAS	IUPAC
Colchicina e Derivados de Colchicina		
colchicina / ácido acetiltrimetilcol - chicínico		(S)-N-(5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxobenzo (a) heptalen-7-il) acetamida
derivados de colchicina		
Carbamatos		
Carbetamida	(R)-1-(etilcarbamoil)etil carbanilato	(2R)-N-etil-2-[[(fenilamino) carbonil] oxil] pro-panamida
cloroprofam		
profam		
Benzamidas		
Pronamida / propizamida	3,5-dicloro-N-(1,1-dimetilpropinil)benzamida	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 duplicadores cromossômicos 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)benzenamina

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-benzenediamina
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)benzenamina
flucloralina	N-(2-cloroetil)-2,6-dinitro-N-propil-4-(trifluorometil)anilina 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)benzenamina
isopropalina	4-isopropil-2,6-dinitro-N,N-dipropil-anilina	4-(1-metiletil)-2,6-dinitro-N,N-dipropilbenzenamina
metalpropalina	α,α,α -trifluoro-N-(2-metilalil)-2,6-dinitro-N-propil-p-toluidina	N-(2-metil-2-propenil)-2,6-dinitro-N-propil-4-(trifluorometil)benzenamina
nitralina	4-metilsulfonil-2,6-dinitro-N,N-dipropil-anilina	4-(metilsulfonil)-2,6-dinitro-N,N-dipropilbenzenamina
orizalina (SURFLAN)	3,5-dinitro-N4,N4-dipropilsulfanilamida	4-(dipropilamino)-3,5-dinitrobenzenosulfonamida
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-fenilenediamina	2,4-dinitro-N3,N3-dipropil-6-(trifluorometil)-1,3-benzenediamina
profluralina	N-ciclopropilmetil- α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N-propil-p-toluidina ou N-ciclopropilmetil-2,6-dinitro-N-propil-4-trifluorometilanilina	N-(ciclopropilmetil)-2,6-dinitro-N-propil-4-(trifluorometil)benzenamina

trifluralina (TREFLAN, TRIFIC, TRILLIN)	α, α, α -trifluoro-2,6- dinitro-N,N-dipropil- p-toluidina	2,6-dinitro-N,N-dipropil-4- (trifluorometil)benzenamina
Fosforoamidatos		
APM (Amiprofosmetil); amiprofosmetil		
Butamifos	O-etil O-6-nitro-m- tolil (RS)-sec- butilfosforamidotioat o	O-etil O-(5-metil-2- nitrofenil) (1- metilpropil) fosforamidotioat o
Piridinas		
Ditiopir		
Tiazopir	metil 2- difluorometil-5-(4,5- dihidro-1,3-tiazol-2- il)-4-isobutil-6- trifluorometilnicotin ato	metil 2-(difluorometil)-5- (4,5-dihidro-2-tiazolil)-4- (2-metilpropil)-6- (trifluorometil)-3- piridinocarboxilato

O agente de duplicação cromossômica pode entrar em contato com o embrião várias vezes. Se o embrião é isolado o agente de duplicação pode entrar em contato imediatamente após o isolamento, e antes da germinação. Se o embrião é contido dentro da semente, pode entrar em contato com o agente de duplicação no momento após a polinização e antes da secagem. Se o embrião está isolado ou não pode entrar em contato com o agente de duplicação a qualquer hora entre as 6 horas após a polinização e 21 dias após a polinização. A duração do contato entre o agente de duplicação cromossômica pode variar. O contato pode ser de menos de 24 horas até cerca de uma semana. A duração do contato é geralmente cerca de 24 horas a 2 dias.

Métodos fornecidos podem ou não passar por uma fase de formação de calo. Os embriões haplóides podem ser colocados em um meio para promover "não-calo". O termo

"meio para promover não-calo" refere-se a um meio que não dá suporte a proliferação de massas desdiferenciadas de células ou tecidos. Um "meio para promover "não-calo" preferido é usado para recuperar embrião, contendo sal e

5 típicas formulações de vitamina bem conhecidas na arte. Nesse resgate de embrião, ou cultura de embrião, meios contém pouca ou nenhuma auxina [para revisão ver Raghaven, V., 1966. Biol. Rev. 41: 1-58]. Meio de

10 maturação de embrião representa também um outro preferido "meio para promover "não-calo"". Meio para maturação do embrião é usado para promover o desenvolvimento dos embriões cultivados *in vitro*, prevenindo a germinação precoce e, normalmente, contém formulações padrão de sal / vitaminas (dependendo da espécie), níveis aumentados de

15 açúcar e / ou ácido abscísico adicionado exogenamente, com pouca ou nenhuma auxina. Outro tipo de meio é usado para brotar cultura, ou superbrotar. Este meio para superbrotar pode novamente conter pouca ou reduzida auxina, mas em vez disso conter níveis elevados de

20 citocinina que promovem a proliferação e crescimento do meristema.

Uma auxina é definida como um hormônio vegetal endógeno, como ácido indol acético (IAA), derivados do

25 IAA, como ácido indol-3-butérico, bem como compostos com atividade auxina-semelhantes, tais como 2,4-D; picloram, dicamba ; 3,4-D, 2,4,5-T e ácido naftaleno acético (NAA).

A citocinina é definida como um hormônio vegetal que

30 ocorre naturalmente, tal como 2-isopentinel adenina

(2iP), zeatina e dihidrozeatina, ou um composto sintético com atividade citocinina-semelhante como cinetina e BAP (beinzilaminopurina).

5 Células haplóides de embriões, sementes, plantas, etc, podem ser identificadas por vários métodos, como, por contagem cromossômica, medição do comprimento das células guarda, ou pela utilização de um citômetro de fluxo.

10

 Marcadores moleculares ou PCR quantitativo podem ser usados para determinar se um tecido ou planta é constituído por células haplóides duplicadas ou é constituído de células diplóides (células obtidas através
15 de polinização normal).

 Embriões haplóides que são obtidos por qualquer uma das técnicas acima podem ser cultivados para regenerar uma planta inteira. Tais técnicas são chamadas resgate de
20 embriões. Meios para resgate de embriões podem incluir determinados fitormônios e fontes de energia ou apenas as fontes de energia. O meio de crescimento também pode conter um agente de seleção, como um biocida e / ou herbicida. Este agente de seleção pode ser usado para
25 indicar um marcador, que foi introduzido através do processo de transformação. Para a transformação e regeneração de milho ver, Gordon-Kamm et al., The Plant Cell 2: 603-618 (1990).

Os métodos fornecidos podem ser executados com qualquer planta. Essas plantas incluem, mas não estão limitadas a *Zea mays* (também identificada como trigo ou milho), soja, óleo de *Brassica*, alfafa, arroz, centeio, 5 sorgo, girassol, tabaco, batata, amendoim, algodão, batata doce, mandioca, beterraba, tomate, aveia, cevada e trigo.

A geração de embriões em plantas é bem conhecida na 10 arte. Técnicas de resgate de embrião podem ser usadas para gerar embriões haplóides duplicados imaturos em plantas (Recent Research Developments in Genetics & Breeding. Vol. 1, Parte II, 287-308 2004). A divulgação está aqui incorporada por referência.

15

A temperatura na qual os métodos podem ser realizados pode variar. Os métodos fornecidos podem ser executados em qualquer temperatura que não mate uma célula vegetal ou planta ou cerca de 16 graus Celsius a 20 32 graus Celsius.

Métodos são fornecidos de produção de embriões haplóides e embriões diplóides não viáveis em uma planta de milho. O método inclui, mas não se limita a produzir 25 cerca de 3% ou mais, cerca de 5% ou mais, ou cerca de 10% ou mais embriões haplóides viáveis. Para o cálculo do percentual, o número total de embriões é determinado pela adição do número de embriões haplóides para o número de embriões que não se desenvolvem corretamente. Os embriões 30 diplóides não-viáveis podem ser selecionados a qualquer

momento após a polinização. O método inclui, mas não está limitado, a seleção em 7-15 dias, em 10-21 dias, ou no momento em que a semente haplóide está plenamente madura, por exemplo, durante ou após a secagem.

5

Métodos são fornecidos para seleção de embriões haplóides de milho por polinização de uma espiga de milho com o pólen de uma linhagem indutora de milho. A linhagem indutora possui um gene que se expressa no embrião e pode ser letal. Na outra localização do genoma a linhagem indutora do milho tem um gene que impede a transmissão do pólen. O gene que impede a transmissão do pólen está intimamente ligado a um gene que, quando expresso no embrião, inibe a letalidade do gene no primeiro local. Assim, quando a espiga do milho é polinizada por esta linhagem indutora não há transmissão de pólen que contém o gene que impede os efeitos letais do gene letal. Apenas o pólen com o gene que é letal para o desenvolvimento dos embriões é transmitido. Quando este pólen é utilizado e a fecundação normal ocorre resultando em um embrião diplóide, o embrião não vai desenvolver por causa da transmissão do gene letal. Quando este pólen é utilizado e a fertilização irregular ocorre resulta em um embrião haplóide. Esse embrião haplóide continuará a desenvolver-se. Devido à ablação dos embriões diplóides, embriões haplóides facilmente serão selecionados em um estágio inicial do desenvolvimento. Tendo o gene letal e o gene inibidor em diferentes locais no genoma, por exemplo, tendo os genes desvinculados, permite-se aos genes segregar a fim de que uma quantidade suficiente de pólen

compreendendo o gene letal seja produzida. O gene que impede a transmissão de pólen está intimamente ligado, ou próximo, ao gene que inibe a ablação do embrião.

5 Outro método fornecido é o desenvolvimento de uma linhagem indutora melhorada, chamada de linhagem indutora de ablação seletiva. Uma linhagem indutora de milho pode ser transformada com dois cassetes de expressão diferentes. O primeiro cassete de expressão inclui um
10 polinucleotídeo que quando expresso no embrião é letal para o embrião ou impede o embrião do desenvolvimento normal. O segundo cassete de expressão inclui um polinucleotídeo que impede pólen transmissível ou viável do desenvolvimento e um polinucleotídeo que, quando
15 expresso no embrião impede a morte ou o crescimento anormal que seria causado pelo polinucleotídeo no primeiro cassete de expressão. O processo de transformação pode ser feito por vários métodos, por exemplo, bombardeamento de partículas ou infecção por
20 agrobacteria. O processo de transformação com os dois cassetes pode ser feito simultaneamente ou sequencialmente com o cassete compreendendo o polinucleotídeo para evitar a letalidade do embrião sendo introgressado na primeira célula vegetal. Os cassetes de
25 expressão precisam segregarem nos gametas, por isso, é preferível que os dois cassetes de expressão não estejam estreitamente ligados. Como parte do método, qualquer linhagem de milho pode ser transformada com o primeiro, ou primeiro e segundo cassete de expressão. O primeiro e
30 / ou segundo cassetes de expressão podem ser usados para

transformar uma ou duas plantas de milho. Os cassetes de expressão podem então ser transferidos simultaneamente ou sequencialmente em uma linhagem indutora de milho por cruzamento. O método pode incluir retrocruzamento de um
5 ou todos os transgenes em uma linhagem indutora de milho. O repressor poderia ser substituído e segregado para fora.

Em qualquer dos métodos divulgados a inibição pode
10 ser descrita por vários mecanismos. Por exemplo, a transcrição do polinucleotídeo letal pode ser prevenida. Este tipo de inibição poderia ser conseguido através de um polinucleotídeo repressor tet que expressa uma proteína que se liga ao gene letal e inibe a expressão.
15 Outros tipos de prevenção da letalidade podem estar no RNA, ou fase de proteína, por exemplo, RNA anti-senso, grampos "hairpins", e outros mecanismos de silenciamento de genes.

Em qualquer destes métodos e produtos, o gene que impede a transmissão do pólen pode ser um gene letal com um promotor pólen-específico. Por exemplo, o gene pode expressar alfa-amilase (Gene Bank L25805), Plant Physiology 105 (2): 759-760 (1994) e pode ser controlado
25 com um promotor PG47 (Patente US 5.412.085; Patente US 5.545.546; J. Plant 3 (2): 261-271 (1993)). Em qualquer um desses métodos e produtos, a expressão do polinucleotídeo que provoca a ablação e o polinucleotídeo que inibe a ablação pode ser controlada por vários tipos
30 de promotores. Por exemplo, o promotor pode ser um

promotor constitutivo, um promotor induzível, ou um promotor tecido-preferido, como um promotor embrião-preferido. Seria mais eficaz se o promotor que dirige o polinucleotídeo que provoca a ablação do embrião não expressasse no endosperma. Ou, se o promotor é expresso no endosperma a expressão seria baixa o suficiente para que ainda determinasse uma diferença de crescimento entre as sementes diplóides (fertilização normal) e as sementes haplóides. Um exemplo de promotor embrião-preferido é lec1.

A invenção divulgada inclui uma linhagem indutora de milho que compreende os dois cassetes de expressão, tal como descrito.

Todas as publicações e pedidos de patentes mencionados nesta especificação são aqui incorporados por referência na mesma dimensão, como se cada publicação ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado a ser incorporado por referência.

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

25 **EXEMPLOS**

Genes gat codificando glifosato-N-acetiltransferase (GAT). Ver publicação PCT WO02/36782 e Pedido de Patente US No. 10/427.692.

lec1-indica um polinucleotídeo ativador transcricional cotilédone folhoso 1. Ver Pedido de

Patente US 09/435,054. Promotor *lec1* é caracterizado na Patente US 7.122.658.

moCah- é um gene de milho otimizado que codifica para a proteína cianamida hidratase [CAH] de *Myrothecium verrucaria* que pode hidratar a cianamida à uréia não tóxica.

pinII- indica inibidor da protease da batata. Ver Ryan (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28: 425-449; Duan et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 494-498.

10 *Pro-* indica uma sequência promotora.

Term- indica uma sequência terminadora.

Ubi Pró- indica um promotor ubiquitina. Ver Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 e Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689)

15 *Ubi1ZM Pro-* indica um promotor de milho ubiquitina.

EXEMPLO 1:

Sementes de linhagens indutoras haplóides, como Stock 6, RWS, KEMS, KMS ou ZMS, são plantadas e auto-
20 polinizadas ou polinizadas em floração. As espigas são esterilizadas na superfície em 30% de Clorox bleach mais 0,5% de Micro detergente durante 20 minutos, e lavadas duas vezes com água estéril.

25 Para transformação de milho mediada por *Agrobacterium* o método de Zhao é utilizado essencialmente como descrito na Pat. US No. 5981840, cujos conteúdos são incorporados por referência. Embriões (geralmente cerca de 7-14 dias após a polinização) são isolados a partir de
30 uma planta de milho e os embriões são contactados com uma

suspensão de *Agrobacterium*, onde as bactérias são capazes de transferir as sequências nucleotídicas de interesse para pelo menos uma célula de pelo menos um dos embriões. A *Agrobacterium* compreende o seguinte cassete de
 5 expressão.

Constructo C:

Promotor ZM-lecl: intronUB1ZM: barstar: terminador
 3' pinII - promotor ZM-PG47: peptídeo de trânsito ZM-BT1:
 10 ZM-alfa-amilase1: terminador 3' ZM-IN2-1 - promotor
 UB1ZM: intron UTR 5': GAT: terminador 3' PINII.

Nesta etapa os embriões são normalmente imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para o início da
 15 inoculação. Preferencialmente, a suspensão de *Agrobacterium* contém 100 µM de acetosiringona. Os embriões são co-cultivados por um tempo com a *Agrobacterium*.

20 Geralmente, esses embriões são cultivados em meio sólido após o estágio de infecção. Após este período de co-cultivo um passo opcional de "descanso" duradouro de 6-7 dias é contemplado. Neste passo de repouso, os embriões são incubados na presença de, pelo menos, um
 25 antibiótico conhecido por inibir o crescimento de *Agrobacterium*, sem a adição de um agente seletivo para os transformantes vegetais. Em seguida, os embriões inoculados são cultivados em meio sólido contendo um agente seletivo para o GAT, que é o herbicida glifosato
 30 (genes *GAT* codificando glifosato-N-acetiltransferase

(GAT). Ver publicação PCT WO02/36782 e Pedido de Patente US No. 10/427, 692).

Após ter sido colocado sobre o meio de seleção o
5 crescente calo transformado é transformado com um segundo
cassete, Constructo D. Desta vez usando bombardeamento de
partículas.

Constructo D:

10 Promotor ZM-lec1: intron LS da batata: barnase:
terminador 3' pinII - promotor UB1ZM: intron 5' UTR:
moPAT: terminador 3' PINII.

Este plasmídio de DNA é precipitado em 1,1µm
15 (diâmetro médio) de pellets de tungstênio usando um
procedimento de precipitação de CaCl₂ da seguinte forma:
100µL de partículas de tungstênio preparadas em água,
10µL (1µg) de DNA em tampão TrisEDTA (1µg total), 100µL
de 2,5M de CaCl₂, 10µL de espermidina 0,1M.

20

Cada reagente é adicionado sequencialmente à
suspensão de partículas de tungstênio, enquanto mantido
no multitubo vortexer. A mistura final é sonicada
brevemente e incubada sob constante agitação durante 10
25 minutos. Após o período de precipitação, os tubos são
centrifugados brevemente, o líquido retirado, lavado com
500µL de etanol 100%, e centrifugado por 30 segundos.
Mais uma vez, o líquido é retirado, e 105µL de etanol
100% é adicionado aos pellets finais de partículas de
30 tungstênio. Para o bombardeamento de partículas, as

partículas de tungstênio / DNA são brevemente sonicadas e 10µL sarapintado no centro de cada macrotransportador e secas a cerca de 2 minutos antes do bombardeamento. As placas de amostra são bombardeadas no nível #4, em arma
5 de partículas #HE34-1 ou #HE34-2. Todas as amostras recebem um único tiro em 650 PSI, com um total de dez alíquotas recolhidas de cada tubo de partículas / DNA preparados.

10 Após o bombardeio, o calo é mantido em meio 560Y por 2 dias e, em seguida, transferido para o meio de seleção contendo o agente de seleção para o gene PAT, bialophos, e subcultivados a cada 2 semanas.

15 Depois de aproximadamente 10 semanas de seleção, os clones de calos resistentes selecionados são transferidos para o meio de regeneração para iniciar plantas. Após maturação do embrião somático (2-4 semanas), embriões somáticos bem desenvolvidos são transferidos para meio de
20 germinação e transferidos para a sala de cultura iluminada. Cerca de 7-10 dias depois, plântulas em desenvolvimento são transferidas para o meio livre de hormônios em tubos por 7-10 dias até as plântulas estarem bem estabelecidas. As plantas são então transferidas para
25 insertos em potes (equivalentes a vaso de 2,5") contendo solo envasado e crescimento por 1 semana em uma câmara de crescimento, posteriormente crescimento em 1-2 semanas adicionais na casa de vegetação e, em seguida, transferidas para 600 vasos clássicos (1,6 litros) e

cultivadas até a maturidade. As plantas são monitoradas e marcadas para o genótipo e / ou fenótipo de interesse.

Meio de bombardeamento compreende 4,0g/L de sais
5 basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0mL/L do Mix de vitamina Eriksson (1000x SIGMA-1511), 0,5mg/L de tiamina HCl, 120,0g/L de sacarose, 1,0mg/L de 2, 4-D, e 2,88g/L de L-prolina (trazida ao volume com DI H2O após ajuste para pH 5,8 com KOH), 2,0g/L de Gelrite (adicionado depois de
10 elevado o volume com DI H2O); e 8,5mg/L de nitrato de prata (adicionado depois de esterilizar o meio e arrefecer à temperatura ambiente). Meio de seleção (560R) compreende 4,0g/L de sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0mL/L do Mix de vitamina Eriksson (1000x SIGMA-1511),
15 0,5mg/L de tiamina HCl, 30,0g/L de sacarose e 2,0mg/L de 2,4-D (trazido ao volume com DI H2O após ajuste para pH 5,8 com KOH), 3,0g/L de Gelrite (adicionado depois de elevar o volume com DI H2O); e 0,85mg/L de nitrato de prata e agente de seleção (ambos acrescentados após
20 esterilizar o meio e arrefecer à temperatura ambiente).

EXEMPLO 2: Produção de embriões haplóides

Após uma ablação a linhagem indutora haplóide é produzida como indicada no Exemplo 1. A linhagem indutora
25 pode ser usada para produzir embriões haplóides. Isto pode ser conseguido através do cultivo de sementes de milho F1. Por exemplo, um milho reprodutor querendo produzir um superior puro com as melhores características da linhagem pura de elite A e da linhagem pura de elite B
30 cruza as duas linhagens para formar sementes híbridas F1.

Esta semente F1 é cultivada juntamente com a linhagem indutora de ablação. O calendário de plantio é de tal ordem que o pólen da linhagem indutora de ablação está pronto a tempo do florescimento de sementes híbridas F1.

- 5 As espigas das plantas F1 são polinizadas com a linhagem indutora de ablação do pólen. Isto pode ser alcançado pelo plantio de linhas alternadas de F1 e a linhagem indutora, e várias combinações destas com F1, ou fêmea, sendo as plantas despigadas antes da polinização. Os
- 10 cruzamentos também podem ser feitos por atirar ensacamento e controlar polinização por mão polinizadoras.

- Após as sementes terem maturado as sementes podem
- 15 ser colhidas e somente as sementes viáveis serão sementes haplóides. A semente haplóide é plantada e, em seguida, sofre duplicação cromossômica usando um agente de duplicação cromossômica como a pronamida.

- 20 **EXEMPLO 3:** Transformação e Regeneração de plantas de milho indutoras transgênicas

- Sementes de milho Hi-II são plantadas. As espigas em 9 -12 dias após a polinização são colhidas e a superfície
- 25 esterilizada em 30% de Clorox bleach mais 0,5% de Microdetergente durante 20 minutos, e lavadas duas vezes com água estéril. Os embriões são isolados a partir de espigas utilizando um bisturi. Embriões são contactados com uma suspensão de *Agrobacterium*, onde as bactérias são
- 30 capazes de transferir as seqüências de nucleotídeo de

interesse para pelo menos uma célula de pelo menos um dos embriões. Neste exemplo, os embriões são co-transformados com 2 Agrobacterias.

- 5 Uma Agrobacteria compreende o seguinte cassete de expressão.

Constructo E:

Promotor ZM-lec1: intron UB1ZM: barstar: terminador
10 3' pinII - promotor ZM-PG47: ZM-BT1 peptídeo de trânsito:
ZM-alfa-amilase 1: terminador 3' ZM-IN2-1 - promotor
UB1ZM: íntron 5'UTR: GAT : terminador 3' PINII.

- A segunda Agrobacteria compreende o seguinte cassete
15 de expressão.

Constructo F:

Promotor ZM-lec1: intron LS da batata: barnase:
terminador 3' pinII - promotor UB1ZM: íntron 5'UTR:
20 moPAT: terminador 3' PINII.

O gene barnase inclui um intron a fim de impedir a expressão de barnase na Agrobacteria.

- O meio de cultura de tecido e o processo são os
25 mesmos descritos acima com o agente de seleção, bialophos. Calo que só compreende o Constructo E será selecionado contra com o uso de bialophos. Calo que só compreende o Construa F não vai regenerar porque o constructo barstar não está disponível para evitar a
30 toxicidade do barnase.

As plantas que serão regeneradas compreendem os Constructos E e F. Estas plantas serão utilizadas para retrocruzamento de ambos construtos em uma linhagem indutora haplóide de milho. Durante o processo de retrocruzamento as linhagens co-transformadas serão avaliadas para determinar a ligação entre os construtos. Quanto mais próximos os constructos estiverem ligados menos transmissão de polinucleotídeos barnase através do pólen irá ocorrer porque vai separar-se com o polinucleotídeo alfa-amilase expresso no pólen tornando o pólen não-viável.

Quando o cruzamento é feito com constructos não ligados, os embriões diplóides são eliminados porque o constructo contendo o barstar não é transmitido através do pólen, e eles só herdam barnase.

Barstar e barnase são ambos expressos no início da embriogênese em transgenes separados, não ligados na linhagem indutora haplóide. Assim, a linhagem indutora haplóide pode ser mantida.

EXEMPLO 4: Transformação e Regeneração de plantas de milho transgênicas indutoras utilizando Agrobacterium compreendendo dois construtos T-DNA.

Um Agrobacterium compreende os 2 seguintes cassetes de expressão.

RB: Promotor ZM-lec1: intron UB1ZM: barstar:
 terminador 3' pinII - promotor ZM-PG47: peptídeo de
 trânsito ZM-BT1: ZM-alfa-amilase 1: ZM-IN2-1 promotor
 terminador 3'-UB1ZM: intron 5'UTR: GAT: terminador 3'

5 PINII: LB

RB: Promotor ZM-lec1: intron LS da batata: barnase:
 terminador 3' pinII - promotor UB1ZM: intron 5'UTR:
 moPAT: terminador 3' PINII: LB

10

Transformação com *Agrobacterium* contendo cassetes
 pode aumentar a eficiência da produção de plantas
 transformadas estavelmente compreendendo os dois cassetes
 em locais no genoma que não estão ligados (Miller et al.
 15 Transgenic Research 11: 381-396, 2002. High efficiency
 transgene segregation in co-transformed maize plants
 using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary
 system.)

20

Diferentemente do vetor, o processo para obter uma
 linhagem indutora haplóide de ablação do milho pode ser a
 mesma indicada no Exemplo 3.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de seleção de embriões haplóides caracterizado por compreender:

- 5 a) polinizar uma primeira planta de milho com o pólen de uma linhagem indutora haplóide de milho para produzir embriões onde a dita linhagem indutora haplóide de milho compreende um polinucleotídeo letal expresso pelo embrião, um polinucleotídeo de
10 não-transmissão de pólen, e um polinucleotídeo inibidor expresso pelo embrião que impede a letalidade do dito polinucleotídeo letal expresso pelo embrião;
- 15 b) produzir embriões haplóides e embriões diplóides não-viáveis; e
- c) selecionar embriões de milho haplóides.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo dito polinucleotídeo letal expresso
20 pelo embrião ser barnase e o dito polinucleotídeo inibidor expresso pelo embrião ser barstar.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo dito polinucleotídeo inibidor expresso
25 pelo embrião inibir a transcrição do dito polinucleotídeo letal expresso pelo embrião.

4. Método de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo dito gene inibidor expresso pelo
30 embrião ser um polinucleotídeo repressor tet e o dito

polinucleotídeo letal expresso pelo embrião ter um promotor para o qual o dito repressor tet se liga.

5. Método de desenvolvimento de uma linhagem indutora
5 haplóide de milho transformada caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- 10 a) obtenção de uma célula transformada pela transformação de uma célula de uma linhagem indutora de milho com um primeiro e um segundo cassete de expressão onde o dito primeiro cassete de expressão compreende um polinucleotídeo letal expresso pelo embrião e onde o dito segundo cassete de expressão compreende um polinucleotídeo de não-transmissão de pólen e um polinucleotídeo inibidor expresso pelo
15 embrião que impede a letalidade do dito polinucleotídeo letal expresso pelo embrião;
- b) regenerar uma planta transformada a partir da dita célula transformada;
- 20 c) autopolinizar a dita planta transformada para obter uma linhagem indutora haplóide de milho transformada.

6. Linhagem indutora haplóide de milho de acordo com a reivindicação 5.

25

7. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico caracterizada por compreender um primeiro e segundo cassete de expressão onde o dito primeiro cassete de expressão compreende um polinucleotídeo que é letal para
30 os embriões e onde o dito segundo cassete de expressão

não é transmitido através de pólen e compreende um polinucleotídeo que inibe a letalidade do dito polinucleotídeo que é letal aos embriões.

5 8. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico de acordo com a reivindicação 7 caracterizada pelo dito polinucleotídeo que é letal para embriões ser um polinucleotídeo barnase e o dito polinucleotídeo que inibe a letalidade do dito polinucleotídeo que é letal
10 para embriões ser um polinucleotídeo barstar.

9. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico de acordo com a reivindicação 7 caracterizada pelo dito polinucleotídeo que é letal para embriões compreender um
15 promotor *lec1*.

10. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico de acordo com a reivindicação 7 caracterizada pelo dito segundo cassete compreender um polinucleotídeo
20 alfa-amilase que inibe a transmissão de pólen.

11. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico de acordo com a reivindicação 10 caracterizada pelo dito polinucleotídeo alfa-amilase compreender um promotor
25 PG47.

12. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico de acordo com a reivindicação 7 caracterizada pelo dito primeiro cassete de expressão compreender um operon e o

dito segundo cassete de expressão compreender um polinucleotídeo repressor.

13. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico de
5 acordo com a reivindicação 12 caracterizada pelo dito operon ser um operon tet e o polinucleotídeo repressor ser um repressor tet.

14. Método de produção de embriões haplóides e embriões
10 diplóides não-viáveis em uma planta.

15. Método de acordo com a reivindicação 14 caracterizado pela percentagem de embriões haplóides na planta ser de pelo menos 3%.

15

16. Método de seleção de embriões haplóides caracterizado por compreender polinizar uma planta de milho com uma linhagem de milho indutora e produzir embriões haplóides e embriões diplóides não-viáveis onde
20 a seleção de embriões haplóides ocorre quando a semente compreendendo o embrião está madura.

17. Método de acordo com a reivindicação 16 caracterizado pela seleção de embriões haplóides ocorrer
25 até cerca de 21 dias após a polinização.

18. Método de acordo com a reivindicação 16 caracterizado pela seleção de embriões haplóides ocorrer a partir de cerca de 7 dias após a polinização até cerca
30 de 15 dias após a polinização.

19. Linhagem indutora haplóide de milho transgênico caracterizada por compreender um primeiro e um segundo cassete de expressão onde o dito primeiro cassete de
5 expressão compreende um polinucleotídeo barnase que está operacionalmente ligado a um promotor *lec1* e é letal para os embriões e onde o dito segundo cassete compreende um polinucleotídeo *barstar* que inibe a letalidade do dito polinucleotídeo que é letal para os embriões e onde o
10 dito segundo cassete de expressão também compreende um polinucleotídeo alfa-amilase operacionalmente ligado a um promotor PG47 onde a expressão do dito polinucleotídeo alfa-amilase operacionalmente ligado a um promotor PG47 não permite a transmissão de pólen.

RESUMO

MÉTODO DE SELEÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES, MÉTODO DE DESENVOLVIMENTO DE UMA LINHAGEM INDUTORA HAPLÓIDE DE MILHO TRANSFORMADA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES E EMBRIÕES DIPLÓIDES NÃO-VIÁVEIS EM UMA PLANTA, MÉTODO DE SELEÇÃO DE EMBRIÕES HAPLÓIDES, LINHAGENS INDUTORAS HAPLÓIDES DE MILHO TRANSGÊNICO

Métodos de seleção de embriões haplóides são divulgados. Métodos de produção de embriões haplóides e embriões diplóides não-viáveis em uma planta são fornecidos. Métodos de seleção de embriões haplóides produzidos a partir de linhagens indutoras haplóides de milho são fornecidos. Métodos de produção de linhagens indutoras haplóides de milho melhoradas são divulgados. Linhagens indutoras haplóides de milho compreendendo transgenes que produzem embriões ablacionados ou diplóides anormais são divulgados.