

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

(21) **PI0617769-7 A2**

(22) Data de Depósito: 23/10/2006  
(43) Data da Publicação: 09/08/2011  
(RPI 2118)



(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/29 2006.01  
C12N 15/82 2006.01  
C12N 5/04 2006.01  
A01H 5/00 2006.01  
A01H 5/10 2006.01

(54) Título: **MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, SEMENTE, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL, MÉTODO DE EXPRESSÃO SELETIVA**

(30) Prioridade Unionista: 24/10/2005 US 60/729,772

(73) Titular(es): Pioneer Hi-Bred International, Inc

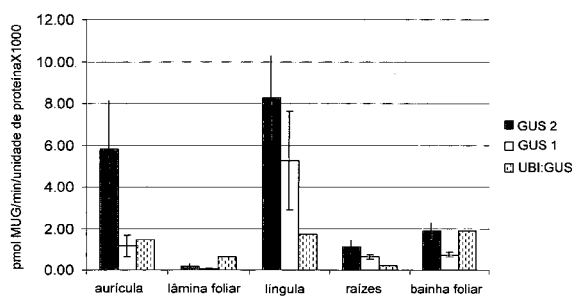
(72) Inventor(es): Douglas A. Rice, Jeanne M. Sandahl, Virginia C. Crane

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT US2006041277 de 23/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/050509 de 03/05/2007

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, SEMENTE, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL, MÉTODO DE EXPRESSÃO SELETIVA A presente invenção fornece composições e métodos para regular a expressão de sequências de nucleotídeo heterólogas em uma planta. As composições incluem uma nova sequência de nucleotídeo para um promotor tecido-preferencial de milho. É fornecido um método para expressar uma sequência de nucleotídeo heteróloga em uma planta usando a sequência promotora aqui apresentada. O método compreende incorporar estavelmente no genoma de uma célula vegetal uma sequência de nucleotídeo operacionalmente ligada ao promotor raiz- preferencial da presente invenção e regenerar plantas estavelmente transformadas que expressam a sequência de nucleotídeo.



MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, SEMENTE, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL, MÉTODO DE EXPRESSÃO SELETIVA

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere ao campo da biologia molecular de plantas, mais especificamente à regulação da expressão gênica em plantas.

10

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Avanços recentes na engenharia genética de plantas permitiram a criação de plantas apresentando características ou traços melhorados, tais como resistência a doença, resistência a insetos, resistência a herbicidas, maior estabilidade ou vida útil do produto final disponibilizado para o consumidor obtido a partir de plantas e melhoria da qualidade nutricional das partes comestíveis da planta. Portanto, um ou mais genes desejados provenientes de uma fonte diferente da planta, mas construídos para conferir características ou qualidades diferentes ou melhoradas, podem ser incorporados ao genoma da planta. Um ou mais novos genes podem, então, ser expressos na célula da planta para apresentar o fenótipo desejado, tal como um novo traço ou nova característica.

Os sinais regulatórios adequados devem estar presentes e devem estar no local adequado no tocante ao gene, a fim de se obter a expressão do gene recém-inserido na célula da planta. Estes sinais regulatórios podem incluir uma região

promotora, uma sequência líder 5' não traduzida e uma sequência 3' de terminação / poliadenilação de transcrição.

Um promotor é uma sequência de DNA que dirige a maquinaria celular de uma planta para produzir RNA a partir de sequência de codificação contígua a jusante (3') do promotor. A região promotora influencia a taxa, o estágio de desenvolvimento e o tipo de célula em que o transcrito de RNA do gene é produzido. A transcrição do RNA é processada para produzir RNA mensageiro (mRNA) que serve como um molde para a tradução da sequência de RNA na sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. A sequência líder 5' não traduzida é uma região do mRNA a montante da região de codificação de proteína que pode representar um papel na iniciação e tradução do mRNA. O sinal 3' de terminação/ poliadenilação de transcrição é uma região não traduzida a jusante da região de codificação da proteína, que funciona nas células vegetais para produzir a terminação da transcrição de RNA e a adição dos nucleotídeos poliadenilato à extremidade 3' do RNA.

A expressão das sequências heterólogas de DNA em um hospedeiro vegetal depende da presença de um promotor operacionalmente ligado que seja funcional dentro do hospedeiro vegetal. O tipo de sequência de promotor escolhido se baseia em quando e como, dentro do organismo, se deseja a expressão do DNA heterólogo. Quando se deseja expressão em tecidos ou órgãos específicos, promotores preferenciais para tecidos podem ser usados. Quando se deseja expressão de gene em resposta a um estímulo, promotores induzíveis são o elemento regulador de escolha.

Em contraste, quando se deseja expressão contínua em todas as células de uma planta, promotores constitutivos são utilizados.

Um promotor induzível é um promotor que é capaz de  
5 ativar direta ou indiretamente a transcrição de uma ou mais  
seqüências de DNA ou de genes em resposta a um indutor. Na  
ausência de um indutor as seqüências de DNA ou genes não  
serão transcritos. O indutor pode ser um agente químico, tal  
como um metabólito, regulador de crescimento, herbicida ou  
10 composto fenólico, ou um estresse fisiológico imposto  
diretamente à planta, tal como frio, calor, sal, toxinas. No  
caso de combater pragas de plantas, é também desejável ter  
um promotor que seja induzido por patógenos de plantas,  
incluindo pragas de inseto em plantas, nematóides ou agentes  
15 de doença, tais como uma bactéria, vírus ou fungos. O  
contato com o patógeno induzirá a ativação da transcrição,  
de modo tal que será produzida uma proteína de combate ao  
patógeno em um momento em que ela será eficaz na defesa da  
planta. Um promotor induzido por patógeno pode também ser  
20 usado para detectar o contato com um patógeno, por exemplo,  
por expressão de um marcador detectável de modo que pode ser  
avaliada a necessidade de aplicar pesticidas. Uma célula  
vegetal que contém um promotor induzível pode ser exposta a  
um indutor por aplicação externa do indutor à célula ou à  
25 planta tal como por pulverização, aspersão, aquecimento ou  
por exposição ao patógeno operativo.

Um promotor constitutivo é um promotor que dirige a  
expressão de um gene nas diversas partes de uma planta e  
continuamente durante todo o desenvolvimento da planta.

Exemplos de alguns promotores constitutivos que são amplamente usados para induzir a expressão de genes heterólogos em plantas transgênicas incluem o promotor de gene nopalina sintase (NOS), proveniente de *Agrobacterium* 5 *tumefaciens*, (patente US 6.034.322), promotores de vírus mosaico de couve flor (CaMv) 35S e 19S (patente US 5.352.605), aqueles derivados de qualquer um dos diversos genes de actina, que são conhecidos como sendo expressos na maioria dos tipos de células (patente US 6.002.068) e o 10 promotor de ubiquitina (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632 e Christensen et al. (1992) 18:675-689) que é um produto gênico conhecido por acumular em muitos tipos de células.

Seqüências reguladoras adicionais a montante e/ou a 15 jusante da seqüência do núcleo do promotor podem ser incluídas em construções de expressão de vetores de transformação para produzir níveis variáveis de expressão de seqüências de nucleotídeos heterólogos em uma planta transgênica. A alteração genética de plantas com o uso de 20 técnicas de engenharia genética para produzir plantas com traços úteis exige, portanto, a disponibilidade de uma variedade de promotores.

A fim de elevar ao máximo a aplicação comercial da tecnologia de plantas transgênicas, é importante direcionar 25 a expressão do DNA introduzido de um modo específico para um local. É desejável produzir compostos defensivos tóxicos, por exemplo, em tecidos sujeitos ao ataque por patógenos, mas não em tecidos que devem ser colhidos e comidos por consumidores. Direcionando ao sítio a síntese ou a

armazenagem de proteínas ou compostos desejáveis, as plantas podem ser manipuladas como fábricas, ou sistemas de produção, para uma variedade tremenda de compostos com utilidade comercial. Os promotores específicos de células proporcionam a capacidade de dirigir a síntese de compostos, no tempo e no espaço, para tecidos ou órgãos altamente especializados, tais como raízes, folhas, tecidos vasculares, embriões, sementes ou flores.

Alternativamente, poderia ser desejável inibir a expressão de uma sequência de DNA nativa dentro de tecidos de uma planta para obter um fenótipo desejado. Neste caso, tal inibição poderia ser obtida com a transformação da planta para compreender um promotor com preferência por tecido ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos antisense, de modo tal que a expressão da sequência antisense produza uma transcrição de RNA que interfira com a tradução do mRNA da sequência de DNA nativa.

Como os padrões de expressão de um gene (ou genes) quimérico(s) introduzido(s) em uma planta são controlados usando promotores, há um interesse constante no isolamento e na identificação de promotores inéditos que sejam capazes de controlar a expressão de um gene (ou genes) quimérico (quiméricos).

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

São propostos composições e métodos para a regulação da expressão gênica em uma planta. As composições compreendem sequências de nucleotídeos novas para um promotor que inicia

a transcrição de um modo tecido-específico. Mais especificamente uma região de iniciação de transcrição isolada de um gene de planta rico em prolina é proposta. Outras concretizações da invenção compreendem a seqüência de

5 nucleotídeos apresentada em SEQ ID NO: 1, a seqüência de nucleotídeos apresentada na SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, fragmentos das seqüências de nucleotídeos apresentadas nas SEQ ID Nos: 1-5 e a seqüência de promotor de planta depositada como Depósito de Patente

10 No. NRRL B-30879 na Coleção de Cultura do Serviço de pesquisa Agrária, do inglês - Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection, sediada na Unidade de Pesquisa em Genômica Microbiana e Bioprocessos do Centro Nacional de Pesquisa para a Utilização da Agricultura, do inglês

15 Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit do National Center for Agricultural Utilization Research (NCAUR) nos termos e condições do Tratado de Budapest. As composições das concretizações compreendem ainda seqüências de nucleotídeos que têm pelo menos 70% de identidade de

20 seqüências com as seqüências apresentadas nas SEQ ID NOs: 1-5, e que dirigem a expressão tecido-específica de uma seqüência de nucleotídeos operacionalmente ligada. Também são incluídas seqüências de nucleotídeos que se hibridizam em condições estringentes ou com a seqüência apresentada em

25 SEQ ID NOs: 1, 3, 4, e 5 ou com a seqüência de promotor de planta depositada em hospedeiros bacterianos como Depósito de Patente NO. NRRL B-30879, ou seus complementos.

As composições também incluem construções de DNA que compreendem um promotor das concretizações ligado

operacionalmente a uma sequência de nucleotídeo heteróloga de interesse, em que o promotor é capaz de dirigir a expressão da sequência de nucleotídeo em uma célula de planta e o promotor compreende as sequências de nucleotídeo das concretizações. As concretizações propõem ainda vetores de expressão e plantas ou células de planta tendo estavelmente incorporado aos seus genomas uma construção de DNA mencionado acima. Além disso, as composições incluem sementes transgênicas de tais plantas.

10 Métodos das concretizações compreendem um meio para expressar seletivamente uma sequência de nucleotídeo em uma planta, compreendendo a transformação de uma célula de planta com uma construção de DNA e a regeneração de uma planta transformada a partir da referida célula de planta, a  
15 construção de DNA compreendendo um promotor e uma sequência de nucleotídeo heteróloga ligada operacionalmente ao promotor, em que o promotor inicia a transcrição tecido-específica da sequência de nucleotídeo em uma célula de planta. Deste modo, as sequências de promotor são úteis para  
20 o controle da expressão de sequências de codificação ligadas operacionalmente de um modo específico para tecido.

A jusante e sob a regulação de iniciação transcricional do promotor haverá uma sequência de interesse que produzirá a modificação do fenótipo da planta. Tal modificação inclui  
25 a modulação da produção de produto endógeno, quanto a quantidade, distribuição relativa, ou semelhantes, ou a produção de um produto de expressão exógena para proporcionar uma função inédita ou produto inédito na planta. Por exemplo, uma sequência de nucleotídeo heteróloga



que codifica um produto de gene que confere resistência a patógeno, herbicida, sal, frio, seca ou inseto incide no âmbito da invenção.

Em outro aspecto, os métodos descritos se referem a um método para a modulação da expressão em tecidos selecionados de uma planta transformada estavelmente compreendendo as etapas de (a) transformação de uma célula vegetal com uma construção de DNA compreendendo o promotor das concretizações ligado operacionalmente a pelo menos uma sequência de nucleotídeo; (b) cultivo da célula de planta em condições de crescimento da planta e (c) regeneração de uma planta estavelmente transformada a partir da célula de planta, em que a expressão da sequência de nucleotídeo altera o fenótipo da planta.

15

#### **DESCRIÇÃO SUCINTA DOS DESENHOS**

A Figura 1 é um gráfico mostrando os níveis de expressão de duas construções compreendendo o promotor Silk419, uma com o íntron ADHI de milho e uma sem ele, juntamente com um vetor de controle UBI:GUS, em plantas transformadas estáveis T0 no estágio V10. Os dados de expressão foram obtidos usando protocolos de ensaio MUG.

25 A Figura 2 é um gráfico mostrando os níveis de expressão de duas construções que compreendem o promotor Silk419, uma com o íntron ADHI de milho e outra sem ele, em plantas transformadas estáveis T0 no estágio R1. Os dados de expressão foram obtidos usando protocolos de ensaio MUG.

Figura 3 é um gráfico mostrando os níveis de expressão de uma construção que compreende o promotor Silk419 com o íntron ADHI do milho em plantas transformadas estáveis T1 no estágio V10. Os dados de expressão foram obtidos usando protocolos de ensaios MUG.

A Figura 4 é um gráfico mostrando os níveis médios de expressão de uma construção compreendendo o promotor Silk419 com o íntron ADHI do milho em plantas transformadas estáveis T1 no estágio R1. Os dados de expressão foram obtidos usando protocolos de ensaios MUG.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

15

As composições das concretizações compreendem seqüências de nucleotídeos inéditas para promotores de planta, especialmente um promotor tecido-preferencial de um gene do milho, mais especificamente, o promotor "419" do milho. Em particular, as concretizações propõem moléculas de ácido nucléico isoladas compreendendo a seqüência de nucleotídeos apresentada nas SEQ ID NOs: 1-5 e a seqüência de promotor de planta depositada em hospedeiros bacterianos como Depósito de Patente No. NRRL B-30879 em 22 de setembro de 2005 e seus fragmentos, variantes e complementos.

25

Um depósito do promotor "419" do milho foi feito em 22 de setembro de 2005 no Agricultural Research Service (ARS) Culture Collection, localizado na Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit do National Center for

Agricultural Utilization Research (NCAUR), nos termos do Tratado de Budapeste. O depósito recebeu o seguinte número de acesso: NRRL B-30879. O endereço de NCAUR é 1815 N. University Street, Peoria, IL, 61604. Este depósito será mantido nos termos do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para os fins de Procedimentos de Patentes. Este depósito foi feito simplesmente como uma conveniência para os versados na técnica e não é uma admissão de que um depósito é exigido nos termos de 35 U.S.C. § 112. O depósito estará disponível irrevogavelmente e sem restrição ou condição para o público após a concessão de uma patente. No entanto, deve ficar subentendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para a prática da invenção em questão em derrogação de direitos de patentes concedidos por ação governamental.

As seqüências de promotor das concretizações são úteis para a expressão de seqüências de nucleotídeos ligadas operacionalmente de um modo tecido-preferencial. Mais especificamente, o promotor das concretizações, quando usado em conjunto com o íntron ADHI do milho e incluindo a 5' UTR nativo, dirige a expressão a níveis altos em diferentes tecidos da planta, mas não constitutivamente. O padrão de expressão é de interesse, pois ele inclui tecidos que são afetados pela podridão do caule e espiga do milho. O promotor dirige a expressão no comprimento do caule, nas raízes, na epiderme interna das bainhas da folha, nas glumas de inflorescência, nas inflorescências femininas, e nos tecidos vasculares do sabugo imediatamente abaixo dos pontos

de ligação aos floretes. O promotor é também ativo no pericarpo, mas somente naquela porção do pericarpo localizada na base do grão na semente madura. O promotor não é ativo no pólen e é somente fracamente ativo nas lâminas da  
5 folha. As seqüências das concretizações também encontram uso na construção de vetores de expressão para transformação subsequente em plantas de interesse, como marcadores moleculares, e semelhantes. As seqüências de promotor 419 das concretizações dirigem a expressão de seqüências de  
10 nucleotídeos ligadas operacionalmente de um modo tecido-preferencial. Portanto, as seqüências de promotor 419 encontram uso na expressão tecido-preferencial de uma seqüência de nucleotídeos ligada operacionalmente de interesse. O método específico usado para obter o promotor  
15 419 das concretizações da presente invenção é descrito no Exemplo 5 que aparece na seção dos Exemplos deste pedido.

As concretizações abrangem composições de ácido nucléico isolado ou substancialmente purificado. Uma molécula de ácido nucléico "isolada" ou "purificada", ou  
20 porção biologicamente ativa sua, é substancialmente isenta de outro material celular, ou de meio de cultura quando produzida por técnicas recombinantes, ou substancialmente isenta de precursores químicos ou de outras substâncias químicas quando sintetizada quimicamente. Um ácido nucléico  
25 "isolado" é essencialmente isento de seqüências (de preferência seqüências codificadoras de proteína) que naturalmente flanqueiam o ácido nucléico (isto é, seqüências localizadas nas extremidades 3' e 5' do ácido nucléico) no DNA genômico do organismo do qual é derivado o ácido

nucléico. Em diversas concretizações, por exemplo, a molécula isolada de ácido nucléico pode conter menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, ou 0,1 kb de seqüências de nucleotídeos que naturalmente flanqueiam a molécula de ácido nucléico no DNA genômico da célula da qual é derivado o ácido nucléico.

O promotor 419 dirige a expressão endógena de um gene de milho que codifica uma proteína rica em prolina (SEQ ID NO: 6) que tem alguma semelhança a uma proteína putativa lipase/hidrolase de motivo GDSL proveniente de arroz (AK100754). Os genes ricos em prolina são conhecidos na técnica como tendo uma ampla variedade de funções em plantas. As lipases da classe GDSL são conhecidas como existindo em plantas (veja Helliwell et al. (2001) Plant Cell 13(9):2115-2126; Cummins & Edwards (2004) Plant Journal 39: 894-904), mas são mais bem conhecidas e caracterizadas em bactérias, nas quais elas geralmente existem com enzimas secretadas ou ligadas a membrana e usam moléculas específicas diferentes como substratos. Veja, por exemplo, Flieger et al. (2002) Infect. Immun. 70(11): 6094-6106; Farn et al. (2001) J. Bacteriol. 183(22):6717-6720; e Carinato et al. (1998) J. Bacteriol. 180(14): 3517-3521.

As composições das concretizações incluem moléculas de ácido nucléico isoladas compreendendo as seqüências de nucleotídeo promotor apresentadas em SEQ ID NOs: 1, 3, 4 e 5. O termo "promotor" se destina a significar uma região reguladora de DNA geralmente compreendendo um TATA-box capaz de dirigir a RNA polimerase II para iniciar a síntese de RNA no sitio de iniciação de transcrição apropriado para uma

seqüência de codificação específica. Um promotor pode, além disso, compreender outras seqüências de reconhecimento geralmente posicionadas a montante ou 5' do TATA-box, denominadas elementos promotores a montante, que influenciam a velocidade de iniciação de transcrição. É fato reconhecido que, tendo-se identificado as seqüências de nucleotídeos para as regiões promotoras descritas no presente documento, a capacidade de isolar e identificar outros elementos regulatórios na região 5' não traduzida a montante das regiões promotoras específicas identificadas no presente documento incide no estado da técnica. Portanto, as regiões promotoras descritas no presente documento podem, por exemplo, ainda compreender elementos regulatórios a montante tais como aqueles responsáveis pela expressão tecidual e temporal da seqüência de codificação, acentuadores e semelhantes. Veja especialmente patente australiana NO. AU-A-77751/94 e patentes US 5.466.785 e 5.635.618. Do mesmo modo os elementos do promotor que permitem a expressão nos tecidos desejados podem ser identificados, isolados e usados com outros promotores de núcleo para conferir expressão com preferência por tecido. Neste aspecto das concretizações, um "núcleo do promotor" se destina a significar um promotor sem elementos promotores.

Dentro do contexto desta descrição, o termo "elemento regulador" também se refere a uma seqüência de DNA, geralmente, mas nem sempre, a montante (5') da seqüência de codificação de um gene estrutural que inclui seqüências que controlam a expressão da região de codificação proporcionando o reconhecimento de RNA polimerase e/ou

outros fatores necessários para que a transcrição seja iniciada em um sítio específico. Um exemplo de um elemento regulador que provê o reconhecimento de RNA polimerase ou outros fatores de transcrição para assegurar a iniciação em um sítio específico é um elemento promotor. Um elemento promotor compreende um elemento núcleo do promotor, responsável pela iniciação da transcrição, assim como outros elementos regulatórios (conforme será discutido em outro local neste pedido) que modificam a expressão genética. Deve também ficar subentendido que seqüências de nucleotídeos localizadas dentro de íntrons, ou a 3' da seqüência de região de codificação, podem também contribuir para a regulação da expressão de uma região de codificação de interesse. Exemplos de íntrons adequados incluem, sem limitação, o íntron IVS6 do milho ou o íntron da actina do milho. Um elemento regulador pode também incluir aqueles elementos que estão localizados a jusante (3') do sítio de iniciação de transcrição, ou no interior de regiões transcritas, ou ambos. Dentro do contexto desta descrição, um elemento regulador pós-transcricional pode incluir elementos que são ativos depois da iniciação da transcrição, por exemplo, acentuadores de tradução e de transcrição, repressores de tradução e de transcrição e determinantes de estabilidade de mRNA.

Os elementos regulatórios, ou seus fragmentos, das concretizações podem ser associados operacionalmente com elementos regulatórios heterólogos ou promotores a fim de modular a atividade do elemento regulador heterólogo. Tal modulação inclui a intensificação ou a repressão da

atividade de transcrição do elemento regulador heterólogo, a modulação dos eventos pós-transcricionais ou tanto a intensificação ou a repressão da atividade de transcrição do elemento regulador heterólogo como a modulação de eventos  
5 pós-transcricionais. Um ou mais elementos regulatórios, por exemplo, ou seus fragmentos, das concretizações podem ser associados operacionalmente com promotores constitutivos, induzíveis ou tecido-preferenciais ou seus fragmentos, para modular a atividade de tais promotores no interior dos  
10 tecidos desejados dentro de células de planta.

As seqüências promotoras tecido-preferenciais de milho das concretizações, quando montadas no interior de uma construção de DNA de tal modo que o promotor esteja ligado operacionalmente a uma seqüência de nucleotídeos de  
15 interesse, permitem a expressão da seqüência de nucleotídeos nas células de uma planta transformada estavelmente com este construto de DNA. O termo "operacionalmente ligado" se destina a significar que a transcrição ou tradução da seqüência de nucleotídeo heteróloga se encontra sob a  
20 influência da seqüência de promotor. "Operacionalmente ligado" também se destina a significar a ligação de duas seqüências de nucleotídeos de modo tal que a seqüência de codificação de cada fragmento de DNA permaneça dentro da matriz de leitura adequada. Deste modo, as seqüências de  
25 nucleotídeos para os promotores das concretizações são providas em construções de DNA juntamente com a seqüência de nucleotídeo de interesse, tipicamente uma seqüência de nucleotídeo heteróloga para a expressão na planta de interesse. O termo "seqüência de nucleotídeo heteróloga" se



destina a significar uma seqüência que não está naturalmente ligada operacionalmente com a seqüência de promotor. Embora esta seqüência de nucleotídeo seja heteróloga em relação à seqüência de promotor, ela pode ser homóloga ou nativa; ou  
5 heteróloga, ou estranha ao hospedeiro na planta.

É fato reconhecido que os promotores das concretizações podem ser usados com suas seqüências de codificação nativas para aumentar ou reduzir a expressão, resultando assim em uma alteração no fenótipo da planta transformada.

10 As modificações das seqüências promotoras isoladas das concretizações podem proporcionar uma faixa de expressão da seqüência de nucleotídeos heteróloga. Assim, elas podem ser modificadas para se tornarem promotores fracos ou promotores fortes. Geralmente um "promotor fraco" se destina a  
15 significar um promotor que dirige a expressão de uma seqüência de codificação a um nível baixo. Um "nível baixo" de expressão se destina a significar a expressão a níveis de aproximadamente 1/10.000 transcritos a aproximadamente 1/10.000 transcritos a aproximadamente 1/500.000  
20 transcritos. Por outro lado, um promotor forte dirige a expressão de uma seqüência de codificação a um nível alto, ou a aproximadamente 1/10 transcritos a aproximadamente 1/100 transcritos a aproximadamente 1/1.000 transcritos.

Os fragmentos e variantes das seqüências de promotor  
25 descritas também incidem no âmbito da invenção. Um "fragmento" significa uma porção da seqüência de promotor. Os fragmentos de uma seqüência de promotor podem conservar atividade biológica e, portanto abranger fragmentos capazes de dirigir a expressão preferida pelo tecido de uma

seqüência de nucleotídeos operacionalmente ligada. Portanto, menos do que a seqüência de promotor inteira, por exemplo, descrita no presente documento pode ser utilizada para dirigir a expressão de uma seqüência de nucleotídeos operacionalmente ligada de interesse, tal como uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína heteróloga. A determinação de que tais fragmentos reduzem ou não os níveis de expressão ou alteram ou não a natureza da expressão, isto é, a expressão constitutiva ou induzível, incide no estado da técnica. Alternativamente, os fragmentos de uma seqüência de nucleotídeos promotora que são úteis como sondas de hibridização, tais como as descritas abaixo, geralmente não conservam esta atividade reguladora. Portanto, os fragmentos de uma seqüência de nucleotídeos podem variar de pelo menos aproximadamente 20 nucleotídeos aproximadamente 50 nucleotídeos, aproximadamente 100 nucleotídeos e até as seqüências de nucleotídeos de comprimento total descritas no presente documento.

Assim, um fragmento da seqüência de nucleotídeos promotora 419 do milho pode codificar uma porção biologicamente ativa do promotor 419 do milho ou pode consistir em um fragmento que pode ser usado como uma sonda de hibridização ou como um "primer" (oligonucleotídeo iniciador) de PCR usando métodos descritos abaixo. Uma porção biologicamente ativa do promotor 419 do milho pode ser preparada isolando uma porção de uma das seqüências de nucleotídeos promotora 419 do milho e avaliando a atividade dessa porção do promotor 419 do milho. As moléculas de ácido nucléico que são fragmentos de uma seqüência de nucleotídeos

promotora compreendem pelo menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000 ou até o número de nucleotídeos presentes na sequência de nucleotídeos promotora de comprimento total descrita no presente documento, tal como 1101 nucleotídeos para SEQ ID NO:1. Três fragmentos específicos do promotor 419, por exemplo, que conservam a atividade promotora são descritos no pedido como SEQ ID NOs: 4, 5 e 6. Os fragmentos truncados do promotor têm 602 pb (SEQ ID NO: 4), 350 pb (SEQ ID NO: 5) e 129 pb (SEQ ID NO: 6) de comprimento.

Os nucleotídeos de tais fragmentos geralmente compreenderão a sequência de reconhecimento TATA da sequência de promotor específica. Tais fragmentos podem ser obtidos pelo uso de enzimas de restrição para clivar a sequência de nucleotídeos promotora que ocorre naturalmente descrita no presente documento; sintetizando uma sequência de nucleotídeos a partir da sequência que ocorre naturalmente da sequência de DNA promotor; ou podem ser obtidos com o uso de tecnologia PCR. Veja, mais especificamente, Mullis et al. (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350, e Erlich, ed. (1989) *PCR Technology* (Stockton Press, Nova York). Variantes destes fragmentos de promotor, tais como as que resultam de mutagênese sítio-direcionada e de um procedimento tal como o "rearranjo" de DNA, são também abrangidas pelas composições.

Um "análogo" dos elementos regulatórios das concretizações inclui qualquer substituição, deleção ou adição à sequência de um elemento regulador desde que o

análogo conserve pelo menos uma propriedade reguladora associada com a atividade do elemento regulador das concretizações. Tais propriedades incluem o direcionamento de preferência por órgão ou tecido, ou uma combinação delas, 5 ou atividade temporal, ou atividade de desenvolvimento, ou uma combinação delas.

O termo "variantes" se destina a significar seqüências que têm uma similaridade substancial com uma seqüência de promotor descrita no presente documento. As seqüências de 10 nucleotídeos, variantes que ocorrem naturalmente tais como estas podem ser identificadas com o uso de técnicas de biologia molecular conhecidas, tais como, por exemplo, com reação em cadeia de polimerase (PCR) e técnicas de hibridização conforme delineado abaixo. As seqüências de 15 nucleotídeos variantes também incluem seqüências de nucleotídeos derivadas sinteticamente tais como as geradas usando-se, por exemplo, mutagênese sítio-direcionada. Geralmente, as variantes de uma seqüência de nucleotídeos específica terão pelo menos 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 20 geralmente pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, to 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de seqüência com aquela seqüência de nucleotídeos específica conforme determinado por programas de alinhamento de seqüências descritos em outro ponto do presente documento 25 usando-se parâmetros default. As variantes biologicamente ativas também incidem no âmbito da presente invenção. As variantes biologicamente ativas incluem, por exemplo, a seqüência de promotor nativa tendo uma ou mais substituições, deleções ou inserções de nucleotídeos. A

atividade de promotor pode ser medida usando-se técnicas tais como análise Northern blot, medições de atividade repórter tomadas de fusões transcricionais e semelhantes. Veja, por exemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova York), doravante "Sambrook", incorporado ao presente documento a título de referência. Alternativamente, os níveis de um gene repórter tal como a proteína fluorescente verde (GFP) ou semelhante produzido sob o controle de um fragmento ou variante de promotor podem ser medidos. Veja, por exemplo, patente US 6.072.050, incorporada ao presente documento a título de referência.

Os métodos para a mutagênese e alterações de seqüências de nucleotídeos são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; patente U.S. No. 4.873.192; Walker e Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nova York) e as referências citadas nelas.

As variantes de seqüências de nucleotídeo promotor também abrangem seqüências derivadas de um procedimento mutagênico e recombinogênico tal como rearranjo de DNA. Com tal procedimento, uma ou mais seqüências de promotor diferentes podem ser manipuladas para criar um novo promotor que possui as propriedades desejadas. Deste modo são geradas bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes de uma população de polinucleotídeos de seqüências relacionadas compreendendo regiões de seqüência que têm uma identidade de seqüências substancial e podem ser recombinadas de modo

homólogo *in vitro* ou *in vivo*. As estratégias para tal rearranjo de DNA são conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; e patentes US 5.605.793 e 5.837.458.

As seqüências de nucleotídeos das concretizações podem ser usadas para isolar as seqüências correspondentes provenientes de outros organismos, especialmente de outras plantas, de outras monocotiledôneas, por exemplo. Deste modo, podem ser usados métodos tais com PCR, hibridização e semelhantes para se identificar tais seqüências baseadas em sua homologia de seqüências à seqüência apresentada no presente documento. Incidem também no âmbito da presente invenção as seqüências isoladas com base na sua identidade de seqüência à seqüência integral de promotor 419 do milho apresentada no presente documento ou a seus fragmentos. As regiões de promotor das concretizações podem ser isoladas de qualquer planta, incluindo, sem limitação, milho (*Zea mays*), *Brassica* (*Brassica napus*, *Brassica rapa ssp.*), alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girassol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium hirsutum*), batata doce (*Ipomoea batatas*), aipim (*Manihot esculenta*), café (*Cofea spp.*), coco (*Cocos*

nucifera), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas (*Citrus spp.*), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa spp.*), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga  
 5 (*Mangifera indica*), azeitona (*Olea europaea*), aveia, cevada, vegetais, plantas ornamentais, e coníferas. As plantas incluem milho, soja, girassol, cártamo, *Brassica* ou canola, trigo, cevada, centeio, alfafa, e sorgo.

Em uma abordagem de PCR, podem ser projetados primers  
 10 de oligonucleotídeos para uso em reações de PCR para amplificar as seqüências correspondentes de DNA a partir de cDNA ou de DNA genômico extraído de qualquer planta de interesse. Métodos para projeto de primers de PCR e para a clonagem por PCR são geralmente conhecidos na técnica e são  
 15 descritos em Sambrook, acima. Veja também Innis *et al.*, eds. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Nova York); Innis e Gelfand, eds. (1995) PCR Strategies (Academic Press, Nova York); e Innis e Gelfand, eds. (1999) PCR Methods Manual (Academic Press,  
 20 Nova York). Métodos conhecidos de PCR incluem, sem limitação, métodos usando-se primers pareados, primers aninhados, primers específicos individuais, primers degenerados, primers específicos de gene, primers específicos de vetor, primers parcialmente malpareados e  
 25 semelhantes.

Em técnicas de hibridização, toda a seqüência de nucleotídeos conhecida ou parte dela é usada como uma sonda que hibridiza seletivamente a outras seqüências de nucleotídeos correspondentes presentes em uma população de

fragmentos de DNA genômico clonados ou fragmentos de cDNA (isto é, bibliotecas genômicas ou de cDNA) de um organismo escolhido. As sondas de hibridização podem consistir em fragmentos de DNA genômico, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA ou outros oligonucleotídeos, e podem ser marcadas com um grupo detectável tal como  $^{32}\text{P}$  ou qualquer outro marcador detectável. Portanto, sondas para hibridização podem, por exemplo, ser produzidas por marcação de oligonucleotídeos sintéticos baseados nas seqüências de promotor 419 do milho das concretizações. Os métodos para a preparação de sondas para a hibridização e para a construção de cDNA e de bibliotecas genômicas são geralmente conhecidos na técnica e são descritos em Sambrook, acima.

A hibridização de tais seqüências pode ser conduzida em condições estringentes. "Condições estringentes" ou "condições de hibridização estringentes" consistem em condições pretendidas nas quais uma sonda se hibridizará à sua seqüência alvo até um ponto detectavelmente maior do que a outras seqüências (pelo menos duas vezes em relação ao fundo, por exemplo). As condições estringentes são dependentes de seqüência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Controlando-se a estringência das condições de hibridização e/ou de lavagem, podem ser identificadas seqüências alvo que tem 100% de complementaridade à sonda (sondagem homóloga). Alternativamente, as condições de estringência podem ser ajustadas para permitir um mau alinhamento nas seqüências de modo que sejam detectados graus inferiores de similaridade (sondagem heteróloga). Geralmente, uma sonda tem menos de



aproximadamente 1000 nucleotídeos de comprimento, freqüentemente menos de 500 nucleotídeos de comprimento.

Tipicamente, as condições estringentes serão aquelas nas quais a concentração de sal é inferior a aproximadamente 1,5 de íon Na, tipicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0M de íon Na de concentração (ou de outros sais) a um pH de 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos aproximadamente 30°C para sondas curtas (10 a 50 nucleotídeos, por exemplo) e de pelo menos aproximadamente 60°C para sondas longas (acima de 50 nucleotídeos, por exemplo). As condições estringentes podem também ser obtidas com a adição de agentes desestabilizantes tais como formamida. As condições de baixa estringência exemplares incluem a hibridização com uma solução tampão de formamida a 30 a 35%, NaCl a 1M, SDS (dodecil sulfato de sódio) a 1% a 37°C, e uma lavagem em 1 X a 2 X SSC (20 X SSC = NaCl a 3,0M/citrato trissódico a 0,3M) a uma temperatura de 50 a 55°C. Condições de estringência moderada exemplar incluem hibridização em formamida a 40 a 45%, NaCl a 1,0M, SDS a 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,5 X a 1 X de SSC a uma temperatura de 55 a 60°C. As condições de alta estringência exemplares incluem a hibridização em formamida a 50%, NaCl a 1M, SDS a 1% a 37°C e uma lavagem em 0,1 x SSC a uma temperatura de 60 a 65°C durante pelo menos 30 minutos. A duração de hibridização é geralmente inferior a aproximadamente 24 horas, geralmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

A especificidade é tipicamente a função de lavagens pós-hibridização, sendo os fatores críticos a intensidade iônica e a temperatura da solução final de lavagem. Para

híbridos de DNA-DNA, o ponto de fusão térmico ( $T_m$ ) pode ser aproximado da equação de Meinkoth e Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284:  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de form}) - 500/L$ ; em que M é a molaridade dos cátions monovalentes, % de GC é porcentagem de nucleotídeos de guanosina e citosina no DNA, % de form é a porcentagem de formamida na solução de hibridização e L é o comprimento do híbrido nos pares de bases. A  $T_m$  é a temperatura (em condições de resistência iônica e pH definidos) à qual 50% de uma sequência alvo complementar se hibridiza a uma sonda perfeitamente pareada.  $T_m$  é reduzida de aproximadamente  $1^\circ\text{C}$  para cada 1% de malpareamentos; portanto a  $T_m$ , as condições de hibridização e/ou condições de lavagem podem ser ajustadas para se hibridizar a sequências da identidade desejada. Se as sequências com  $\geq 90\%$  de identidade são procuradas, por exemplo, a  $T_m$  pode ser reduzida de  $10^\circ\text{C}$ . Geralmente as condições estridentes são selecionadas para se encontrarem aproximadamente  $5^\circ\text{C}$  abaixo da  $T_m$  para a sequência específica e o seu comprimento a uma intensidade iônica e pH definidos. NO entanto, condições gravemente estridentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 1, 2, 3, e  $4^\circ\text{C}$  abaixo da  $T_m$ ; condições de estringência moderada podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8 9 ou  $10^\circ\text{C}$  abaixo da  $T_m$ ; condições de baixa estringência podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14 15 ou  $20^\circ\text{C}$  abaixo da  $T_m$ . Usando-se a equação, composições de hibridização e de lavagem e  $T_m$  desejada, os versados na técnica compreenderão que as variações na estringência das soluções de hibridização e/ou lavagem são

inerentemente descritas. Se o grau desejado de malpareamento resultar em uma  $T_m$  de menos de 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução em formamida), é preferível se aumentar a concentração de SSC de modo que possa ser usada uma temperatura mais elevada. Um guia extenso para a hibridização de ácidos nucleicos se encontra em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nova York); e Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova York), doravante "Ausubel". Veja, também, Sambrook acima.

Assim, incidem no âmbito da presente invenção as seqüências isoladas que têm atividade de promotor tecido-preferencial e que se hibridizam em condições estringentes às seqüências promotoras 419 do milho descritas no presente documento, ou com seus fragmentos.

Em geral, as seqüências que têm atividade promotora e que se hibridizam às seqüências de promotor descritas no presente serão pelo menos 40% a 50% homólogas, aproximadamente 60% a 70% homólogas e até mesmo aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95% a 98% homólogas ou mais às seqüências descritas. Isto é, a similaridade de seqüências das seqüências pode variar, compartilhando pelo menos aproximadamente 40% a 50%, aproximadamente 60% a 70%, e até mesmo 80%, 85%, 90%, 95% a 98% de similaridade de seqüências.

Os termos abaixo são usados para descrever as relações entre seqüências entre dois ou mais ácidos nucleicos ou

polinucleotídeos: (a) "seqüência de referência", (b) "janela de comparação", (c) "identidade de seqüências", (d) "porcentagem de identidade de seqüências" e (e) "identidade substancial".

5           (a) Conforme empregado no presente, "seqüência de referência" é uma seqüência definida usada como uma base para a comparação de seqüências. Uma seqüência de referência pode ser um subconjunto de uma seqüência especificada ou a seqüência integral; como um segmento de um cDNA ou seqüência  
10 de gene de comprimento total, por exemplo, ou o cDNA ou seqüência de gene completas.

          (b) Conforme empregado no presente, "janela de comparação" faz referência a um segmento contíguo e especificado de uma seqüência de polinucleotídeo em que a  
15 seqüência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, falhas) em comparação com a seqüência de referência (que não compreende nem adições nem deleções) para um alinhamento ótimo das duas seqüências. Geralmente a janela de comparação tem pelo menos  
20 20 nucleotídeos contíguos de comprimento e opcionalmente pode ter 30, 40, 50, 100 ou mais. Os versados na técnica observarão que para se evitar um alto grau de similaridade a uma seqüência de referência devido à inclusão de falhas na seqüência de polinucleotídeo uma penalidade para a falha é  
25 tipicamente introduzida e é subtraída do número de pareamentos.

Os métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem conhecidos na técnica. Portanto, a determinação de porcentagem de identidade de seqüências entre quaisquer duas

seqüências pode ser obtida usando-se um algoritmo matemático. Exemplos não limitantes de tais algoritmos matemáticos são o algoritmo de Myers e Miller (1988) CABIOS 4:11-17; o algoritmo de homologia local de Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; o algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman e Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; o método de busca por similaridade de Pearson e Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; o algoritmo de Karlin e Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como em Karlin e Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

As implementações por computador destes algoritmos matemáticos podem ser utilizadas para a comparação de seqüências para se determinar a identidade de seqüências. Tais implementações incluem, sem limitação: CLUSTAL no programa PC/Gene (disponível de Intelligenetics, Mountain View, Califórnia); o programa ALIGN (Versão 2.0); o programa ALIGN PLUS (Versão 3.0, copyright 1997); e GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package de Genetics Computer Group, Versão 10 (disponível de Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, CA, 92121, USA). A matriz de contagem usada na Versão 10 do Wisconsin Genetics Software Package é BLOSUM62 (veja Henikoff e Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

Os alinhamentos que usam estes programas podem ser conduzidos usando-se os parâmetros default. O programa CLUSTAL é descrito por Higgins et al. (1988) Gene 73:237-244 (1988); Higgins et al. (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al.

(1992) CABIOS 8:155-65; e Pearson et al. (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331. Os programas ALIGN e ALIGN PLUS são baseados no algoritmo de Myers e Miller (1988) acima. Uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade para  
5 prolongamento de falha de 12 e uma penalidade para a falha de 4 pode ser usada com o programa ALIGN quando se comparam seqüências de aminoácidos. Os programas BLAST de Altschul et al.. (1990) J. Mol. Biol. 215:403 são baseados no algoritmo de Karlin e Altschul (1990) acima. As buscas de nucleotídeos  
10 por BLAST podem ser conduzidas com o programa BALSTN, contagem = 100, comprimento de palavra = 12, para obter seqüências de nucleotídeos homólogas a uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína das concretizações. As buscas de proteínas por BLAST podem ser conduzidas com o  
15 programa BALSTX, contagem = 50, comprimento de palavra = 3, para se obter seqüências de aminoácidos homólogas à proteína ou polipeptídeo das concretizações. Para se obter os alinhamentos com falhas para fins de comparação pode ser utilizado Gapped BLAST (em BLAST 2.0) conforme descrito em  
20 Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Alternativamente, PSI-BLAST (em BLAST 2.0) pode ser usado para conduzir a busca repetida que detecta relações distantes entre moléculas. Veja Altschul et al. (1997) acima. Quando se utiliza BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST os  
25 parâmetros default dos programas respectivos (BLASTN, por exemplo, para seqüências de nucleotídeos, BALSTX para proteínas) pode ser usado. Veja o sítio na Internet para o National Center for Biotechnology Information.

A não ser que seja declarado em contrário, os valores de identidade/similaridade de seqüências fornecidos no presente documento se referem ao valor obtido usando-se o programa GAP com parâmetros default, ou qualquer programa  
5 equivalente. "Programa equivalente" se destina a descrever qualquer programa de comparação de seqüências que, para quaisquer duas seqüências em questão, gera um alinhamento que tem pareamentos de nucleotídeos ou de resíduos de aminoácidos idênticos e uma identidade de seqüências de  
10 porcentagem idêntica quando comparado com o alinhamento correspondente gerado por GAP.

O programa GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch (1980) acima, para encontrar o alinhamento de duas seqüências completas que maximiza o número de pareamentos e  
15 minimiza o número de falhas. GAP considera todos os alinhamentos e posições de falhas possíveis e cria o alinhamento com o número máximo de bases pareadas e com um número mínimo de falhas. Ele permite que se crie uma penalidade para a criação de falha e uma penalidade para o  
20 prolongamento da falha em unidades de bases pareadas. GAP deve fazer um ganho do número de pareamentos por penalidade para a criação de falha para cada falha que ele insere. Se for selecionada uma penalidade para o prolongamento de falha acima de zero, GAP deve, além disso, fazer um ganho para  
25 cada falha inserida do comprimento da falha vezes a penalidade para o prolongamento de falha. Os valores de penalidade para a criação de falha default e os valores de penalidade para o prolongamento de falha na Versão 10 do Wisconsin Genetics Software Package para seqüências de

proteína são 8 e 2 respectivamente. Para seqüências de nucleotídeos a penalidade para a criação de falha default é 50 ao passo que a penalidade para o prolongamento de falha default é 3. As penalidades para a criação de falha e para o  
5 prolongamento de falha podem ser expressas como um número inteiro selecionado do grupo de números inteiros consistindo em 0 a 200. Assim, as penalidades para a criação de falha e para o prolongamento de falha podem ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou  
10 mais.

(c) Conforme empregado no presente, "identidade de seqüências" ou "identidade" dentro do contexto de duas seqüências de ácidos nucléicos ou de polipeptídeos faz referência aos resíduos nas duas seqüências que são iguais  
15 quando alinhadas para uma correspondência máxima sobre uma janela de comparação especificada. Quando a porcentagem de identidade de seqüências é usada com referência a proteínas, é reconhecido o fato de que as posições de resíduos que não são idênticas freqüentemente diferem por substituições  
20 conservadas de aminoácidos, em que os resíduos de aminoácidos são usados em vez de outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas semelhantes (carga ou hidrofobicidade, por exemplo) e não alteram, portanto, as propriedades funcionais da molécula. Quando as seqüências  
25 diferem em substituições conservadas, a porcentagem de identidade de seqüências pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Diz-se que as seqüências que diferem por tais substituições conservadas têm "similaridade de seqüências" ou "similaridade". Os meios



para a produção deste ajuste são conhecidos dos versados na técnica. Tipicamente isto envolve se dar uma contagem de uma substituição conservada como um malpareamento parcial e não um malpareamento total, aumentando assim a porcentagem de  
5 identidade de seqüências. Assim, no caso em que um aminoácido idêntico recebe uma contagem de 1, por exemplo, e uma substituição não conservada recebe uma classificação de zero, uma substituição conservada recebe uma contagem entre zero e 1. A contagem de substituições conservadas é  
10 calculada conforme implementado no programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Califórnia), por exemplo.

(d) Conforme empregado no presente, "porcentagem de identidade de seqüências" significa o valor determinado comparando-se duas seqüências com alinhamento ótimo sobre  
15 uma janela de comparação, em que a porção da seqüência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, falhas) em comparação com a seqüência de referência (que não compreende nem adições nem deleções) para alinhamento ótimo das duas seqüências. A  
20 porcentagem é calculada determinando-se o número de posições em que ocorre uma base de ácido nucléico ou resíduo de aminoácido idêntico nas duas seqüências para produzir o número de posições pareadas, dividindo-se o número de posições pareadas pelo número total de posições na janela de  
25 comparação, e multiplicando-se o resultado por 100, para se obter a porcentagem de identidade de seqüências.

(e) (i) O termo "identidade substancial" de seqüências de polinucleotídeos significa que um polinucleotídeo compreende uma seqüência que tem pelo menos 70% de

identidade de seqüências, pelo menos 80%, 90%, ou 95%, em comparação a uma seqüência de referência usando-se um dos programas de alinhamento descritos usando-se parâmetros padrão. Os versados na técnica reconhecerão que estes

5 valores podem ser adequadamente ajustados para se determinar a identidade correspondente de proteínas codificadas por duas seqüências de nucleotídeos levando-se em conta a degeneração do códon, a similaridade de aminoácidos, o posicionamento da matriz de leitura e semelhantes. A

10 identidade substancial de seqüências de aminoácidos para tais fins normalmente significa uma identidade de seqüências de pelo menos 60%, 70%, 80%, 90% ou 95%.

Uma outra indicação de que as seqüências de nucleotídeos são substancialmente idênticas é o fato de que

15 duas moléculas se hibridizam entre si em condições estridentes. Geralmente as condições estridentes são selecionadas para se encontrarem aproximadamente 5°C abaixo da  $T_m$  para a seqüência específica a uma intensidade iônica definida e a um pH definido. No entanto as condições

20 estridentes abrangem temperaturas na faixa de aproximadamente 1°C a aproximadamente 20°C abaixo da  $T_m$ , dependendo do grau desejado de estridência, conforme qualificado de outro modo no presente documento. Os ácidos nucléicos que não se hibridizam entre si em condições

25 estridentes ainda serão substancialmente idênticos se os polipeptídeos que eles codificam são substancialmente idênticos. Isto pode ocorrer, quando uma cópia de um ácido nucléico, por exemplo, é criada usando-se o máximo de degeneração de códon permitida pelo código genético. Uma

indicação de que duas seqüências de ácidos nucléicos são substancialmente idênticas é quando o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucléico é imunologicamente trans-reativo com o polipeptídeo codificado pelo segundo  
5 ácido nucléico.

A seqüência de promotor 419 do milho, descrita no presente documento, assim como suas variantes e fragmentos, são úteis para a engenharia genética de plantas, por exemplo, para a produção de uma planta transformada ou  
10 transgênica, para expressar um fenótipo de interesse. Conforme empregado no presente, os termos "planta transformada" e "planta transgênica" se referem a uma planta que compreende no interior do seu genoma um polinucleotídeo heterólogo. Geralmente o polinucleotídeo heterólogo é  
15 estavelmente integrado no interior do genoma de uma planta transgênica ou transformada de modo tal que o polinucleotídeo é passado para gerações sucessivas. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado ao genoma sozinho ou como parte de uma construção recombinante de DNA.  
20 Deve ficar subentendido que conforme empregado no presente, o termo "transgênico" inclui qualquer célula, linhagem de células, calo, tecido, parte de planta ou planta cujo genótipo tenha sido alterado pela presença do ácido nucléico heterólogo incluindo aqueles transgênicos deste modo  
25 alterados assim como aqueles criados por cruzamento sexual ou propagação assexuada a partir do transgênico inicial. O termo "transgênico", conforme empregado no presente, não abrange a alteração do genoma (cromossômico ou extra-cromossômico) por métodos de cruzamento vegetal convencional

ou por eventos que ocorrem naturalmente tais como fertilização cruzada aleatória, infecção viral não recombinante, transformação bacteriana não recombinante, transposição não recombinante, ou mutação espontânea.

5 Um "evento" transgênico é produzido pela transformação de células vegetais com uma construção de DNA heterólogo, incluindo uma construção de ácido nucléico de DNA que compreende um transgene de interesse, a regeneração de uma população de plantas resultante da inserção do transgene no  
10 genoma da planta e a seleção de uma planta específica caracterizada pela inserção em um local específico do genoma. Um evento é fenotipicamente caracterizado pela expressão do transgene. A nível genético, um evento é parte da constituição genética de uma planta. O termo "evento"  
15 também e refere à progênie produzida por um extra-cruzamento sexual entre o transformante e uma outra variedade que inclui o DNA heterólogo.

Conforme empregado no presente, o termo "planta" inclui referência a plantas integrais, órgãos de plantas (folhas,  
20 caule, raízes, por exemplo, etc.), sementes, células de planta e sua prole. Deve ficar subentendido que partes de plantas transgênicas, dentro do âmbito das concretizações compreendem, por exemplo, células de planta, protoplastos, tecidos,, calo, embriões, assim como flores, caules, frutos,  
25 óvulos, folhas ou raízes se originando em plantas transgênicas ou sua progênie anteriormente transformada com uma molécula de DNA da invenção, e consistindo, portanto, pelo menos em parte em células transgênicas.

Conforme empregado no presente, o termo "célula de planta" inclui, sem limitação, culturas de suspensão de sementes, embriões, regiões meristemáticas, tecido do calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen e micrósporos. A classe de plantas que pode ser usada nos métodos das concretizações é geralmente é tão ampla como a classe de plantas superiores passíveis de serem submetidas a técnicas de transformação, incluindo tanto plantas monocotiledôneas como dicotiledôneas.

As seqüências de promotor e os métodos descritos no presente documento são úteis na regulação da expressão de qualquer seqüência de nucleotídeos heteróloga em uma planta hospedeira. Portanto, a seqüência de nucleotídeos heteróloga ligada operacionalmente aos promotores descritos no presente documento pode consistir em um gene estrutural codificando uma proteína de interesse. Os genes de interesse refletem os mercados comerciais e os interesses dos envolvidos no desenvolvimento da cultura. As culturas e os mercados de interesse se modificam, e à medida que as nações em desenvolvimento abrem mercados globais, também emergirão novas culturas e tecnologias. Além disso, à medida que aumenta a nossa compreensão das características e facetas agronômicas tais como rendimento e heterose, a escolha de genes para a transformação se alterará proporcionalmente. As categorias gerais de genes de interesse para as concretizações incluem, por exemplo, aqueles genes envolvidos em informação, tais como "zinc fingers", os envolvidos em comunicação, tais como as quinases e os envolvidos em administração, tais como proteína de choque

térmico. As categorias mais específicas de transgenes incluem, por exemplo, genes que codificam proteínas que conferem resistência a estresse abiótico, tal como estiagem, temperatura, salinidade e toxinas tais como pesticidas e herbicidas ou a estresse biótico, tal como ataques por fungos, vírus, bactérias, insetos e nematóides, e desenvolvimento de doenças associadas com estes organismos. Diversas alterações no fenótipo são de interesse incluindo a modificação da expressão de um gene em um tecido vegetal específico, a alteração de um mecanismo de defesa da planta contra patógeno ou inseto, o aumento da tolerância da planta a herbicidas, a alteração do desenvolvimento tecidual para responder ao estresse do ambiente e semelhantes. Os resultados podem ser obtidos provendo-se a expressão de produtos heterólogos ou um aumento da expressão de produtos endógenos nas plantas. Alternativamente, os resultados podem ser obtidos provendo-se a redução da expressão de um ou mais produtos endógenos, especialmente de enzimas, transportadores, ou cofatores, ou afetando a absorção de nutrientes na planta. Estas alterações resultam em uma alteração no fenótipo da planta transformada.

É fato reconhecido que qualquer gene de interesse pode ser ligado operacionalmente às seqüências promotoras descritas no presente documento e expressas em tecidos de planta.

Uma construção de DNA que compreende um destes genes de interesse pode ser usado com técnicas de transformação, tais como as descritas abaixo para criar resistência a doença ou a insetos em fenótipos de plantas suscetíveis ou para

aumentar a resistência a doença ou a insetos em fenótipos de plantas resistentes. Conseqüentemente esta divulgação abrange métodos que são voltados para a proteção de plantas contra patógenos fúngicos, bactérias, vírus, nematóide, insetos e semelhantes. "Resistência a doença" ou "resistência a insetos" significa que as plantas evitam sintomas prejudiciais que são o resultado de interações planta-patógeno.

Os genes de resistência a doença e de resistência a insetos tais com lisozimas, cecropinas, maganinas ou tioninas para proteção antibacteriana ou as proteínas relacionadas com a patogênese (PR) tais como as glucanases e quitinases para proteção antifúngica, ou endotoxinas *Bacillus thuringiensis*, inibidores de protease, collagenases, lectinas, e glicosidases para o controle de nematóides ou de insetos são todos exemplos de produtos genéticos úteis.

Os patógenos das concretizações incluem, sem limitação, vírus ou viróides, bactérias, insetos, nematóides, fungos e semelhantes. Os vírus incluem vírus mosaico do tabaco ou pepino, vírus de mancha anular, vírus da necrose, vírus mosaico anão do milho etc. Os nematóides incluem nematóides parasíticos tais como nó da raiz, cisto e nematóides de lesão etc.

Os genes que codificam traços de resistência a doença incluem genes de detoxificação, tais como contra fumonisina (patente US 5.792.931) genes de avirulência (avr) e de resistência a doença (R) (Jones et al. (1994) Science 266:789; Martin et al. (1993) Science 262:1432; Mindrinos et al. (1994) Cell 78:1089); e semelhantes. Os genes de

resistência a insetos podem codificar a resistência a pragas que tem um grande impacto sobre o rendimento tais como verme da raiz, verme cortador, broca européia do milho, e semelhantes. Tais genes incluem, por exemplo, genes de  
 5 proteína tóxica a *Bacillus thuringiensis* (patentes US 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser et al. (1986) Gene 48:109); lectinas (Van Damme et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24:825); e semelhantes.

Os traços de resistência a herbicida podem ser  
 10 introduzidos em plantas por genes que codificam a resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de acetolactato sintase (ALS), especialmente os herbicidas do tipo sulfoniluréia (o gene de acetolactato sintase (ALS), por exemplo, contendo mutações que levam a tal resistência,  
 15 especialmente as mutações S4 e/ou Hra), genes que codificam a resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de glutamina sintase, tais como fosfinotricina ou Basta® (glufosinato) (o gene bar, por exemplo) ou outros tais genes conhecidos na técnica. O gene bar codifica resistência ao  
 20 herbicida Basta®, o gene *nptII* codifica a resistência aos antibióticos canamicina e geneticina e o gene de ALS codifica a resistência ao herbicida clorsulfuron.

A resistência a glifosato é conferida por genes de 5-enolpiruvl-3-fosfiquimato sintase (EPSP) mutante e *aroA*.  
 25 Veja, por exemplo, a patente US 4.940.835 concedida a Shah et al., que divulga a seqüência de nucleotídeos de uma forma de EPSPS que pode conferir resistência a glifosato. A patente US No. 5.627.061 concedida a Barry et al. também descreve genes que codificam enzimas EPSPS. Veja também



patentes US 6.248.876; 6.040.497; 5.804.425; 5.633.435; 5.145.783; 4.971.908; 5.312.910; 5.188.642; 4.940.835; 5.866.775; 6.225.114; 6.130.366; 5.310.667; 4.535.060; 4.769.061; 5.633.448; 5.510.471; RE 36.449; RE 37.287; e  
5 5.491.288; e as publicações internacionais WO 97/04103; WO 97/04114; WO 00/66746; WO 01/66704; WO 00/66747 e WO 00/66748, que são incorporadas ao presente documento a título de referência para tal fim. A resistência a glifosato é também conferida a plantas que expressam um gene que  
10 codifica uma enzima glifosato óxido-reductase, conforme descrito com mais detalhes nas patentes U.S. Nos. 5.776.760 e 5.463.175, que são incorporadas ao presente documento a título de referência para tal fim. Além da resistência a glifosato, pode ser conferida a plantas pela super-expressão  
15 de genes que codificam glifosato N-acetil-transferase. Veja, por exemplo, pedidos de patentes US Nos. de Série 10/004.357; e 10/427.692.

Os genes da esterilidade podem também ser codificados em uma construção de DNA e proporcionar uma alternativa à  
20 retirada física do cacho. Exemplos de genes usados de tal modo incluem genes com preferência a tecido masculino e genes com fenótipos de esterilidade masculina tais como QM, descrito na patente US 5.583.210. Outros genes incluem quinases e os que codificam compostos tóxicos ou ao  
25 desenvolvimento gametofítico masculino ou feminino.

Os traços comerciais podem também ser codificados em um gene ou genes que poderiam aumentar, por exemplo, amido para a produção de etanol ou proporcionar a expressão de proteínas. Um outro uso comercial importante de plantas

transformadas é a produção de polímeros e bioplásticos tais como os descritos na patente U.S. No. 5.602.321. Genes tais como  $\beta$ -cetotiolase, PHBase (polihidróxi-butirato sintase) e acetoacetil-CoA reductase (veja Schubert et al. (1988) J. Bacteriol. 170: 583705847) facilitam a expressão de polihidróxi-alcenoatos (PHAs).

Os traços agronomicamente importante que afetam a qualidade do grão, tais como níveis e tipos de óleos, saturados e insaturados, qualidade e quantidade de aminoácidos essenciais, níveis de celulose, amido e teor de proteína podem ser geneticamente alterados usando-se os métodos das concretizações. As modificações incluem o aumento do teor de ácido oléico, óleos saturados e insaturados, o aumento de níveis de lisina e enxofre, a provisão de aminoácidos essenciais e a modificação do amido. As modificações da proteína hordotionina em milho são descritas nas patentes US 5.990.389; 5.885.801; 5.885.802 e 5.703.049; incorporadas ao presente documento a título de referência. Um outro exemplo consiste em proteína de semente rica em lisina e/ou enxofre codificada pelo de albumina 2S de soja descrita na patente US 5.850.016, depositado em 20 de março de 1996, e o inibidor de quimotripsina da cevada, Williamson et al. (1987) Eur. J. Biochem. 165:99-106, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência.

Os produtos exógenos incluem enzimas e produtos vegetais assim como os provenientes de outras fontes incluindo procariontes e outros eucariontes. Tais produtos incluem enzimas, cofatores, hormônios e semelhantes.

Exemplos de outros genes aplicáveis e seu fenótipo associado incluem o gene que codifica a proteína do capsídeo viral e/ou RN, ou outros genes virais ou de plantas que conferem resistência viral; genes que conferem resistência a

5 fungos; genes que conferem resistência a insetos; genes que promovem o aumento do rendimento; e genes que proporcionam resistência a estresse, tal como a desidratação resultante de calor e salinidade, metais tóxico ou elementos de traços, ou semelhantes.

10 "RNAi" se refere a uma série de técnicas correlatas para a redução da expressão de genes (veja, por exemplo, patente US 6.506.559). Técnicas mais antigas denominadas por outros nomes são consideradas hoje em dia como se apoiando no mesmo mecanismo, mas receberam nomes diferentes na

15 literatura. Estes incluem "inibição antisense", a produção de transcritos de RNA antisense capazes de suprimir a expressão da proteína alvo, e "co-supressão" ou "supressão sense" que se referem à produção de transcritos de RNA no sentido, capazes de suprimir a expressão de genes estranhos

20 ou endógenos idênticos ou substancialmente semelhantes (patente US 5.231.020, incorporada ao presente documento a título de referência). Tais técnicas se apóiam no uso de construções que resultam no acúmulo de RNA de dois filamentos com uma complementaridade de filamento ao gene

25 alvo a ser silenciado. A sequência de promotor 419 do milho e os seus fragmentos ou variantes correlatas biologicamente ativas descritas no presente documento, podem ser usada para dirigir a expressão de construções que resultará na interferência no RNA incluindo microRNAs e siRNAs.

A sequência de nucleotídeos heteróloga ligada de modo operativo ao promotor 419 do milho e a sequências promotoras correlatas descritas no presente documento podem consistir em uma sequência antisense para um gene alvo. A terminologia

5 "sequência de nucleotídeos de DNA antisense" se destina a significar uma sequência que tem uma orientação inversa à orientação normal 5- a 3' daquela sequência de nucleotídeos. Quando fornecida em uma célula de planta, a expressão da

10 sequência de nucleotídeos de DNA para o gene alvo. A sequência de nucleotídeos antisense codifica uma transcrição de RNA que é completar e capaz de se hibridizar com o RNA mensageiro (mRNA) endógeno produzido pela transcrição da

15 sequência de nucleotídeos de DNA para o gene alvo. Neste caso, a produção da proteína nativa codificada pelo gene alvo é inibida para se obter uma resposta fenotípica desejada. As modificações das sequências antisense podem ser feitas desde que as sequências se hibridizem e interfiram na

20 expressão do mRNA correspondente. Deste modo, podem ser usadas construções antisense que têm pelo menos 70%, 80% ou 85% ou mais de identidade de sequências às sequências antisense correspondentes. Além disso, porções dos nucleotídeos antisense podem ser usadas para destruir a

25 expressão do gene alvo. Geralmente, podem ser usadas sequências de pelo menos 50 nucleotídeos, 100 nucleotídeos, 200 nucleotídeos ou mais. Portanto, as sequências promotoras descritas no presente documento podem ser ligadas operacionalmente a sequências de DNA antisense para reduzir

ou inibir a expressão de uma proteína nativa nos tecidos de planta selecionados.

Em uma concretização, as construções de DNA compreenderão uma região de iniciação de transcrição compreendendo uma das seqüências de nucleotídeos de promotor descritas no presente documento, ou variantes ou fragmentos seus, ligados operacionalmente a uma seqüência de nucleotídeos heteróloga cuja expressão deve ser controlada pelo promotor com preferência a tecido das concretizações. Tal construção de DNA é dotada com uma multiplicidade de sítio de restrição para a inserção da seqüência de nucleotídeos a se encontrar sob a regulação transcricional das regiões reguladoras. A construção de DNA pode, além disso, conter genes marcadores de seleção.

A construção de DNA incluirá na direção 5'-3' da transcrição, uma região de iniciação de transcrição (isto é um promotor com preferência a tecido das concretizações), região de iniciação da tradução, uma seqüência de nucleotídeos heteróloga de interesse, uma região de terminação da tradução e, opcionalmente, uma região de terminação de transcrição funcional no organismo do hospedeiro. As regiões reguladoras (isto é, promotores, regiões reguladoras transcripcionais e regiões de terminação da tradução) e/ou o polinucleotídeo das concretizações pode ser nativo/análogo à célula hospedeira ou um ao outro. Alternativamente, as regiões reguladoras e/ou o polinucleotídeo das concretizações podem ser heterólogos à célula hospedeira ou um em relação ao outro. Conforme empregado no presente, "heterólogo" com referência a uma

seqüência é uma seqüência que se origina de uma espécie estranha, ou, se for proveniente da mesma espécie, é substancialmente modificada a partir da sua forma nativa na composição e/ou *lócus* genômico por intervenção humana deliberada. Um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo heterólogo, por exemplo, é proveniente de uma espécie diferente da espécie da qual o polinucleotídeo foi derivado, ou, se for da mesma espécie/espécie análoga, um ou os dois são substancialmente modificados a partir da sua forma original e/ou o *lócus* genômico, ou o promotor não é o promotor nativo para o polinucleotídeo operacionalmente ligado.

A região de terminação opcionalmente incluída pode ser nativa com a região de iniciação de transcrição, pode ser nativa com o polinucleotídeo operacionalmente ligado de interesse, pode ser nativa com a planta hospedeira ou pode ser derivada de outra fonte (isto é, ser estranha ou heteróloga) ao promotor, ao polinucleotídeo de interesse, à hospedeira ou à qualquer combinação deles. As regiões de terminação convenientes são disponíveis de plasmídeo-Ti de *A. tumefaciens*, tais como regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. Veja 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 et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; e Joshi et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:9627-9639. Em concretizações específicas é utilizado o terminador do gene do inibidor II (PinII) de protease de

batata particular. Veja, por exemplo, Keil *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:5641-5650; e An *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:115-122, incorporados ao presente documento a título de referência integralmente.

5        A construção de DNA que compreende uma seqüência de promotor das concretizações ligada operacionalmente a uma seqüência de nucleotídeos heteróloga pode também conter pelo menos uma seqüência de nucleotídeos adicional para um gene a ser co-transformado no organismo. Alternativamente, pode(m)  
10    ser provida(s) seqüência(s) adicional(ais) em uma outra construção de DNA.

Caso seja adequado, a seqüência de nucleotídeos heteróloga cuja expressão se encontra sob o controle da seqüência de promotor tecido-preferencial das concretizações  
15    e qualquer(qualsquer) seqüência(s) de nucleotídeos adicional(ais) pode(m) ser otimizada(s) para um aumento da expressão na planta transformada. Isto é, estas seqüências de nucleotídeos podem ser sintetizadas usando-se códons com preferência para a planta para um aumento da expressão.  
20    Existem métodos disponíveis na técnica para a síntese de seqüências de nucleotídeos com preferência para a planta. Veja, por exemplo, patentes US 5.380.831 e 5.436.391, e Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, incorporados ao presente documento a título de referência.

25        Modificações de seqüências adicionais são conhecidas por aumentar a expressão gênica em um hospedeiro celular. Estas modificações incluem a eliminação de seqüências que codificam sinais de poliadenilação espúrios, sinais de sítio da recomposição éxon-íntron, repetições semelhantes à

transposons, e outras seqüências tais bem caracterizadas que podem ser prejudiciais à expressão genética. O teor de G-C da seqüência de nucleotídeos heteróloga pode ser ajustado à média de níveis para um hospedeiro celular dado, conforme  
5 calculado por referência a genes conhecidos expressos na célula hospedeira. Quando possível, a seqüência é modificada para evitar estruturas de mRNA secundárias em "hairpin" previstas.

As construções de DNA podem, além disso, conter  
10 seqüências líderes 5'. Tais seqüências líderes podem atuar para melhorar a tradução. Os líderes de tradução são conhecidos na técnica e incluem: líderes picornavírus, líder EMCV (região 5' não codificadora de encefalomiocardite) (Elroy-Stein et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA  
15 86:6126-6130), por exemplo; líderes potivírus, líder TEV (Vírus de Entalhe do Tabaco), por exemplo, (Allison et al. (1986) Virology 154:9-20); líder MDMV (Vírus do Mosaico Anão do Milho); proteína de ligação de cadeia pesada de imunoglobulina humana (BiP) (Macejak et al. (1991) Nature  
20 353:90-94); líder não traduzido do mRNA da proteína do capsídeo do vírus do mosaico da alfafa (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) Nature 325:622-625); líder vírus do mosaico do tabaco (TMV) (Gallie et al. (1989) Molecular Biology of RNA, páginas 237-256); e líder de vírus de manchas cloróticas do  
25 milho (MCMV) (Lommel et al. (1991) Virology 81:382-385). Veja, também, Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiology 84:965-968. Outros métodos para se aumentar a tradução e/ou a estabilidade de mRNA podem também ser utilizados, íntrons, por exemplo, tais como o íntron de ubiquitina do milho



(Christensen e Quail (1996) Transgenic Res. 5:213-218; Christensen et al. (1992) Plant Molecular Biology 18:675-689) ou o íntron AdhI do milho (Kyozyuka et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 228:40-48; Kyozyuka et al. (1990) Maydica 35:353-357), e semelhantes.

As construções de DNA das concretizações podem também incluir outros acentuadores ("enhancers"), ou acentuadores de tradução ou de transcrição, conforme possam ser necessários. Estas regiões de acentuador são bem conhecidas dos versados na técnica e podem incluir o códon de iniciação AT e seqüências adjacentes. O códon de iniciação deve estar em fase com a matriz de leitura da seqüência de codificação para assegurar a tradução da seqüência integral. Os sinais de controle de tradução e os códons de iniciação podem ser provenientes de uma variedade de origens, tanto natural com sintética. As regiões de iniciação da tradução podem ser providas da fonte da região de iniciação de transcrição ou do gene estrutural. A seqüência pode também ser derivada do elemento regulador selecionado para expressar o gene e pode ser especificamente modificada de modo a aumentar a tradução do mRNA. É fato reconhecido que para se aumentar os níveis de transcrição, podem ser utilizados acentuadores em combinação com as regiões de promotor da descrição. Os acentuadores são conhecidos na técnica e incluem a região acentuadora SV40, o elemento acentuador 35S e semelhantes.

Ao se preparar a construção de DNA, podem ser manipulados os diversos fragmentos de DNA, de modo a proporcionar as seqüências de DNA na orientação adequada e, conforme apropriado na matriz de leitura adequada. Para tal

fim, podem ser empregados adaptadores ou "linkers" para  
 ligar os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem  
 estar envolvidas para proporcionar sítios de restrição  
 convenientes. Podem ser acrescentados ou removidos sítios de  
 5 restrição, pode ser removido o DNA supérfluo ou podem ser  
 introduzidas outras modificações semelhantes nas seqüências  
 das concretizações. Para tal fim, pode estar envolvida  
 mutagênese *in vitro*, reparo de primer, restrição,  
 desnaturação, re-substituições, tais como transições e  
 10 transversões, por exemplo.

Os genes repórteres ou genes marcadores de seleção  
 podem ser incluídos nas construções de DNA. Exemplos de  
 genes repórteres adequados conhecidos na técnica podem ser  
 encontrados, por exemplo, em Jefferson *et al.* (1991) em  
 15 Plant Molecular Biology Manual, ed. Gelvin *et al.* (Kluwer  
 Academic Publishers), pp. 1-33; DeWet *et al.* (1987) Mol.  
 Cell. Biol. 7:725-737; Goff *et al.* (1990) EMBO J. 9:2517-  
 2522; Kain *et al.* (1995) BioTechniques 79:650-655; e Chiu *et*  
*al.* (1996) Current Biology 6:325-330.

20 Os genes marcadores de seleção para a seleção de  
 células ou tecidos transformados podem incluir genes que  
 conferem resistência a antibiótico ou resistência a  
 herbicidas. Exemplos de genes marcadores de seleção  
 adequados incluem, sem limitação, os genes que codificam  
 25 resistência a cloranfenicol (Herrera Estrella *et al.* (1983)  
 EMBO J. 2:987-992); metotrexato (Herrera Estrella *et al.*  
 (1983) Nature 303:209- 213; Meijer *et al.* (1991) Plant Mol.  
 Biol. 76:807-820); higromicina (Waldron *et al.* (1985) Plant  
 Mol. Biol. 5:103-108; Zhijian *et al.* (1995) Plant Science

708:219- 227); estreptomomicina (Jones *et al.* (1987) *Mol. Gen. Genet.* 270:86-91); espectinomomicina (Bretagne-Sagnard *et al.* (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); bleomicina (Hille *et al.* (1990) *Plant Mol. Biol.* 7:171-176); sulfonamida (Guerineau  
5 *et al.* (1990) *Plant Mol. Biol.* 75:127-136); bromoxinila (Stalker *et al.* (1988) *Science* 242:419-423); glifosato (Shaw *et al.* (1986) *Science* 233:478-481); fosfinotricina (DeBlock *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518).

Outros genes que poderiam servir na recuperação de  
10 eventos transgênicos, mas que poderiam não ser necessários no produto final incluiriam, sem limitação, exemplos tais como GUS (b-glicuronidase; Jefferson (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387), GFP (proteína de fluorescência verde; Chalfie *et al.* (1994) *Science* 263:802), luciferase (Riggs *et al.*  
15 (1987) *Nucleic Acids Res.* 75(19):8115 e Luehrsen *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 276:397-414), e os genes do milho que codificam a produção de antocianina (Ludwig *et al.* (1990) *Science* 247:449).

As moléculas de ácido nucléico das concretizações são  
20 úteis nos métodos direcionados à expressão de uma sequência de nucleotídeos em uma planta. Isto pode ser obtido por transformação de uma célula de planta de interesse com uma construção de DNA compreendendo um promotor identificado no presente documento, ligado operacionalmente a uma sequência  
25 de nucleotídeos heteróloga e por regeneração de uma planta estavelmente transformada a partir da célula de planta. Os métodos das concretizações são também direcionados a expressão seletiva de uma sequência de nucleotídeos em um tecido vegetal. Esses métodos compreendem a transformação de

uma célula de planta com uma construção de DNA que compreende um promotor identificado no presente documento que inicia a transcrição tecido-preferencial em uma célula de planta ligado operacionalmente a uma sequência de  
5 nucleotídeos heteróloga e a regeneração de uma planta transformada a partir da célula de planta.

A construção de DNA que compreende a sequência de promotor específico das concretizações operacionalmente ligada a uma sequência de nucleotídeos de interesse pode ser  
10 usada para a transformação de qualquer planta. Deste modo, podem ser obtidas plantas, células de planta, tecidos vegetais, sementes, raízes e semelhantes geneticamente modificados, isto é, transgênicos ou transformados.

As espécies de plantas adequadas para as concretizações  
15 incluem, sem limitação, milho (*Zea mays*), *Brassica sp.* (*B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*, por exemplo), especialmente aquelas espécies de *Brassica* úteis como fontes de óleo de sementes, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum*  
20 *vulgare*), painço (por exemplo, pearl millet (*Pennisetum glaucum*), proso millet (*Panicum miliaceum*), foxtail millet (*Setaria itálica*), finger millet (*Eleusine coracana*), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*),  
25 tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata doce (*Ipomoea batatus*), aipim (*Manihot esculenta*), café (*Cofea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas

(*Citrus* spp.), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), azeitona (*Olea europaea*), mamão (*Carica* 5 *papaya*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa (*Prunus amygdalus*), beterraba açucareira (*Beta vulgaris*), cana de açúcar (*Saccharum* spp.), aveia, cevada, vegetais, plantas ornamentais e coníferas.

Os legumes incluem tomates (*Lycopersicon esculentum*), 10 alface (*Lactuca sativa*, por exemplo), vagem (*Phaseolus vulgaris*), feijão lima (*Phaseolus limensis*), ervilhas (*Lathyrus* spp.), e membros do gênero *Cucumis*, tais como pepino (*C. sativus*), cantalupo (*C. cantalupensis*), e melão (*C. melo*). As plantas ornamentais incluem azálea 15 (*Rhododendron* spp.), hortênsia (*Macrophylla hydrangea*), hibiscos (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa* spp.), tulipas (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petúnias (*Petunia hybrida*), cravo (*Dianthus caryophyllus*), bico de papagaio (*Euphorbia pulcherrima*), e crisântemo.

20 As coníferas que podem ser empregadas na colocação em prática das concretizações incluem, por exemplo, pinheiros tais como *Pinus taeda*, *Pinus elliotii*, pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa*), pinheiro lodgepole (*Pinus contorta*), e pinheiro de Monterey (*Pinus radiata*); pinheiro Douglas-fir 25 (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta do oeste (*Tsuga canadensis*); abeto de Sitka (*Picea glauca*); sequóia (*Sequoia sempervirens*); pinheiros verdadeiros como pinheiro prateado (*Abies amabilis*) e pinheiro do bálsamo (*Abies balsamea*); e cedros tais como o cedro vermelho do Oeste (*Thuja plicata*) e

cedro amarelo do Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Plantas das concretizações podem ser plantas de culturas (por exemplo, milho, alfafa, girassol, Brassica, soja, algodão, cártamo, amendoim, sorgo, trigo, painço, tabaco etc.) A presente invenção é especialmente adequada para qualquer membro da família de plantas monocotiledôneas que inclui, sem limitação, milho, arroz, cevada, aveia, trigo, sorgo, centeio, cana de açúcar, abacaxi, inhame, cebola, banana, coco e tâmaras.

10       Conforme empregado no presente, "vetor" se refere a uma molécula de DNA tal como plasmídeo, cosmídeo, ou fago bacteriano para a introdução de uma construção de nucleotídeo, por exemplo, uma construção de DNA em uma célula hospedeira. Os vetores de clonagem contêm tipicamente  
15       um sítio de restrição ou um número pequeno de sítios de restrição de reconhecimento de endonuclease em que podem ser inseridas seqüências de DNA estranho de um modo determinável sem perda de uma função biológica essencial do vetor, assim como um gene marcador que é adequado para uso na  
20       identificação e seleção de células transformadas com o vetor de clonagem. Os genes marcadores tipicamente incluem genes que proporcionam resistência a tetraciclina, resistência a higromicina ou resistência a ampicilina.

      Os métodos das concretizações envolvem a introdução de  
25       uma construção de nucleotídeo em uma planta. O termo "introdução" é usado no presente documento para significar a apresentação à planta da construção de nucleotídeo de tal modo que a construção ganhe acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos das concretizações não dependem de um

método específico para a introdução de uma construção de nucleotídeo a uma planta, sendo necessário somente que a construção de nucleotídeo ganhe acesso ao interior de pelo menos uma célula da planta. Os métodos para a introdução de 5 construções de nucleotídeo nas plantas são conhecidos na técnica, incluindo, sem limitação, métodos de transformação estável, métodos de transformação transitória e métodos mediados por vírus.

10 "Transformação estável" se destina a significar que a construção de nucleotídeo é introduzida em uma planta se integra ao genoma da planta e é capaz de ser herdada por sua progênie. "Transformação transitória" se destina a significar que a construção de nucleotídeo introduzida em uma planta não se integra ao genoma da planta.

15 As construções de nucleotídeos das concretizações podem ser introduzidas em plantas colocando-se as plantas em contato com um vírus ou com ácidos nucléicos virais. Geralmente tais métodos envolvem a incorporação de uma construção de nucleotídeo das concretizações ao interior de 20 uma molécula de DNA ou RNA viral. Os métodos para a introdução de construções de nucleotídeos nas plantas e a expressão e uma proteína neles codificada, envolvendo moléculas de DNA ou RNA viral são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, patentes US 5.889.191, 5.889.190, 25 5.866.785, 5.589.367 e 5.316.931; incorporadas ao presente documento a título de referência.

Os protocolos de transformação assim como os protocolos para a introdução de seqüências de nucleotídeos em plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou célula de

planta, isto é, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, visadas para a transformação. Os métodos adequados para a introdução de seqüências de nucleotídeos em células de planta e a inserção subsequente no genoma da planta incluem

5 microinjeção (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* (patentes U.S. Nos. 5.981.840 e 5.563.055), transferência genética direta (Paszkowski et al. (1984) *EMBO*

10 *J.* 3:2717-2722), e aceleração de partícula balística (veja, por exemplo, patentes US 4.945.050; 5.879.918; 5.886.244; 5.932.782; Tomes et al. (1995) in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg e Phillips (Springer-Verlag, Berlin); e McCabe et al. (1988)

15 *Biotechnology* 6:923-926). Veja 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

20 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); patentes U.S. Nos. 5.240.855; 5.322.783 e

25 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 97:440-444 (milho); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (milho); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature* (Londres) 311:763-764; patente U.S. 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, Nova York), pp. 197-209 (pólen); Kaeppler et al. (1990) Plant Cell Reports 9:415-418 and Kaeppler et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 84:560-566 (transformação mediada por vibrissas); D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495-1505 (eletroporação); Li et al. (1993) Plant Cell Reports 12:250-255 e Christou e Ford (1995) Annals of Botany 75:407-413 (arroz); Osjoda et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750 (milho por meio de *Agrobacterium tumefaciens*); todas incorporadas ao presente documento a título de referência.

As células que tiverem sido transformadas podem ser cultivadas em plantas de acordo com meios convencionais. Veja, por exemplo, McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. Estas plantas podem então ser cultivadas e ou polinizadas com a mesma cepa transformada ou diferentes cepas, e o híbrido resultante tendo a expressão com preferência a tecido da característica fenotípica desejada identificada. Duas ou mais gerações podem ser cultivadas para se assegurar de que a expressão tecido-preferencial da característica fenotípica desejada é mantida de modo estável e é herdada, sendo então as sementes colhidas para se assegurar e que a expressão com preferência a tecido da característica fenotípica desejada foi atingida. Portanto, conforme empregado no presente, "sementes" transformadas se referem a sementes que contêm a construção de nucleotídeo estavelmente integrado ao genoma da planta.

Há uma variedade de métodos para a regeneração de plantas a partir de tecido vegetal. O método específico de regeneração dependerá do tecido vegetal de partida e da espécie da planta específica a ser regenerada. A  
5 regeneração, o desenvolvimento, e o cultivo de plantas a partir de transformantes de protoplastos de uma única planta ou de diversos explantes transformados são conhecidos na técnica (Weissbach e Weissbach, (1988) Em: Methods for Plant Molecular Biology, (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego,  
10 CA). Este processo de regeneração e cultivo tipicamente inclui as etapas de seleção de células transformadas, cultura destas células individualizadas através dos estágios habituais do desenvolvimento embrionário através do estágio de plântulas enraizadas. Os embriões e sementes transgênicas  
15 são regeneradas de modo análogo. Os brotos enraizados transgênicos resultantes são em seguida plantados em um meio de cultura adequada para plantas tal como solo. As plantas regeneradas são geralmente auto-polinizadas para produzir plantas transgênicas homozigóticas. Caso contrário, o pólen  
20 obtido das plantas regeneradas é cruzado com plantas criadas de sementes de linhagens agronomicamente importantes. Por outro lado, o pólen proveniente de plantas destas linhagens importantes é usado para polinizar as plantas regeneradas. Uma planta transgênica das concretizações que contém um  
25 polipeptídeo desejado é cultivada usando-se métodos conhecidos dos versados na técnica.

As concretizações proporcionam composições para testar compostos que modulam a expressão no interior de tecidos selecionados de embriões e plantas. Os vetores, células e

plantas podem ser usados para se testar moléculas candidatas para agonistas e antagonistas do promotor 419 do milho. Um gene repórter pode ser ligado operacionalmente a um promotor 419 do milho e ser expresso como um transgene em uma planta.

- 5 Os compostos a serem testados são acrescentados e a expressão do gene repórter é medida para se determinar o efeito sobre a atividade do promotor.

Os exemplos abaixo são dados a título de ilustração e não como limitação.

10

### **EXPERIMENTOS**

- As concretizações são ainda definidas nos exemplos abaixo, em que as partes e porcentagens são em peso e os
- 15 graus são Celsius, a não ser que seja declarado em contrário. As técnicas em biologia molecular foram tipicamente conduzidas conforme descrito em Ausubel ou Sambrook, acima. Deve ficar subentendido que estes Exemplos, embora indicando determinadas concretizações, são dados a
- 20 título de ilustração somente. Da discussão abaixo e destes Exemplos, os versados na técnica poderão determinar as características das concretizações, e sem se afastar do espírito e âmbito delas, pode introduzir diversas alterações e modificações nas concretizações para adaptá-las a diversos
- 25 usos e condições. Assim, diversas modificações das concretizações além das apresentadas e descritas no presente documento se tornarão aparentes aos versados na técnica com a leitura da descrição acima. Tais modificações são também destinadas a incidir no âmbito das reivindicações apenas.

O conteúdo de cada referência apresentada no presente documento é integralmente incorporado a título de referência.

5        **Exemplo 1: Identificação de gene em biblioteca enriquecida com inflorescência feminina.**

O gene 419 foi identificado como tendo um promotor que poderia dirigir a expressão preferencialmente em uma  
10 biblioteca de espiga imatura durante um teste de cDNA subtrativo. Foi construída uma biblioteca de cDNA a partir de espigas imaturas de milho em lambda ZAP<sup>TM</sup> (Stratagene, LaJolla, CA) usando os protocolos recomendados pelo fabricante. Os sobrenadantes de colônia foram testados com  
15 sonda marcada com <sup>32</sup>P sintetizada a partir de mRNA isolado de espigas imaturas de milho (Sambrook). Os clones que se hibridizaram bem acima do fundo foram purificados e seqüenciados.

20        **Exemplo 2: Caracterização da expressão usando Northern Blots**

As hibridizações Northern foram usadas para confirmar o enriquecimento em espiga imatura do gene 419. Foi conduzido  
25 um exame de tecidos de milho numa variedade de estágios de desenvolvimento. O total de RNA foi extraído usando-se TriReagent<sup>TM</sup> (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) de acordo com as instruções do fabricante, com base nos métodos desenvolvidos por Chomczynski e Sacchi ((1987))

Anal. Biochem. 162, 156-159). RNA foi fracionado em géis de agarose a 1,3% contendo aldeído fórmico a 2,2M (Sambrook), e transferido para membrana de GT ZetaProbe™ (Bio-Rad, Hercules, CA) por ação capilar usando-se 20 X SSC. As

5 manchas foram submetidas a 120.000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  de luz UV para produzir a reticulação do RNA. A pré-hibridização e a hibridização ocorreram a 65°C em fosfato de sódio a 0,25M, pH 7,2, SDS a 7%. A sonda consistia em 419 cDNA rotulado com  $^{32}\text{P}$ . As manchas foram lavadas duas vezes, durante 30 minutos

10 cada, em fosfato de sódio a 20M, pH 7,2, SDS a 7%, em seguida mais duas vezes durante 30 minutos cada, em fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,2, SDS a 1%, todas a 65°C. Depois da lavagem, as manchas foram secadas ao ar, cobertas com filme plástico e expostas a uma película de raios X. Nenhuma

15 expressão foi detectada nas raízes, lâminas foliares em R1 (o estágio no qual a planta do milho está em flor), no pólen ou no cerne do caule em R1. Foi detectada uma expressão moderada em folhas cotiledonares, nas cascas, nas bainhas de folhas R1, grãos e espigas imaturas 8 dap (dias após a

20 polinização). Foram detectados níveis muito altos de expressão em inflorescências femininas receptivas não polinizados, no cacho pré-meiótico e nas língulas.

### **Exemplo 3: Organização genômica (Southern blots)**

25

Hibridizações Southern usando a sequência cDNA 419 como uma sonda indicam que o gene é uma cópia única. O DNA genômico foi extraído de folhas cotiledonares do milho de acordo com Chen e Dellaporta (Urea-based Plant DNA Miniprep

In Freeling, M; Walbot, V, eds, (1994) The Maize Handbook. Springer-Verlag, Nova York, pp 526-527). Os southern-blots foram construídos usando DNA digerido com SstI, HindIII ou EcoRV de acordo com Dellaporta e Moreno (Southern Blot Hybridization In The Maize Handbook, supra, pp 569-572). O blotting, hibridização, lavagem e detecção foram conduzidos como para os northern-blots, veja o Exemplo 2, exceto que a transferência de DNA para a membrana de náilon ocorreu em 10 X SSC. Em cada caso, foi detectada somente uma faixa com hibridização intensa.

#### **Exemplo 4: Experimentos *in situ***

A sonda usada para os protocolos *in situ* tinha a metade do comprimento de clone de cDNA (~0,7 kb) no fagemídeo pBK-CMV (Stratagene). O plasmídeo foi linearizado com Sad para a sonda antisense (T7) e com SmaI para a sonda no sentido (T3) usando as RNA polimerases correspondentes (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As sondas de RNA foram marcadas com digoxigenina e hibridizadas a seções de tecido de acordo com Jackson (Jackson, DP (1991) In situ hybridization in plants. Em DJ Bowles, SJ Gurr, M. McPherson, eds, Molecular Plant Pathology: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, pp 163-174), com modificações de acordo com Bradley et al. (Bradley D, et al. (1993) Cell 72:85-95.). A detecção mediada por anticorpo levou ao desenvolvimento do sinal depois de uma incubação de um dia para o outro indicando um nível alto de expressão.

Em inflorescências femininas maduras antes da fertilização (ponta, meio e base), foi observada uma expressão intensa em todas as células em todos as inflorescências femininas, incluindo epiderme, mas a  
5 expressão era fraca ou ausente na parte de floema dos feixes vasculares. Os elementos do xilema mostraram um sinal intenso.

Em espigas imaturas, foi observada uma expressão intensa na célula mãe de megasporos de óvulos nas espigas  
10 primárias de plantas de 7 semanas. Neste estágio, as inflorescências femininas começaram a crescer, mas o seu comprimento não excede o da inflorescência como um todo. 419 foi expresso nos fios vasculares da inflorescência feminina, mas não nas demais células da inflorescência feminina. O  
15 sinal foi também detectado nos estames, no florete rudimentar (inferior) e nos feixes vasculares da espiga. Foi observado em toda a espiga um nível muito baixo de sinal, possivelmente não acima do fundo.

Nos grãos e glumas em desenvolvimento, antes da  
20 fertilização foi observada uma expressão total de baixo nível do gene, mas o sinal era mais intenso nas glumas externas.

Em espigas primárias imaturas de plantas de 5 semanas, 419 estava expresso a um nível muito baixo, quando era, em  
25 todo o meristema da espiga e nas folhas jovens das cascas. A expressão era sucessivamente mais intensa em folhas de cascas mais velhas (externas). Neste estágio, os primórdios das espículas já estavam formados, mas os primórdios do órgão floral ainda não tinham se diferenciado.

Nos meristemas de brotos vegetativos de plantas de 17 dias, 419 estava expresso a um nível muito baixo, quando estava. A expressão era sucessivamente mais intensa em folhas mais velhas (externas) e no tecido dos nós.

5 Foi observada uma expressão intensa em todas as células da aurícula, incluindo na epiderme. O sinal parecia um tanto mais fraco nas células com paredes celulares especialmente fortes, tais como os elementos metaxilêmicos dos feixes vasculares e nas células esclerenquimatosas localizadas  
10 acima e abaixo dos feixes vasculares principais.

Foi observada uma expressão intensa em todas as células da língula, incluindo na epiderme. Não havia nenhum sinal nas células com reforços de parede celular forte que estavam localizados na periferia.

15 Havia uma expressão intensa na lâmina foliar em praticamente todas as células. Foi observado um sinal especialmente intenso nos feixes vasculares (xilema e floema) e nas células do esclerênquima.

Nas pontas das raízes adventícias de plantas de 3  
20 semanas, praticamente nenhuma expressão detectável na coifa da raiz e no meristema radicular. O sinal foi sucessivamente mais intenso em células mais diferenciadas ao longo do eixo da raiz.

Controle Negativo: Uma sonda sense não produziu nenhum  
25 sinal em qualquer um dos tecidos descritos acima. Uma exceção consistiu na lâmina foliar, onde houve um sinal fraco no esclerênquima e em alguns dos elementos menores do xilema. No entanto, a diferença em intensidade de sinal em comparação com a sonda antisense era muito evidente.



Concluindo, o gene 419 mostrou uma expressão intensa nas inflorescências femininas, mas não exclusivamente neste tecido. A língua, a aurícula e a lâmina foliar também apresentaram uma expressão intensa e ocorreu uma expressão  
5 fraca nos grãos, glumas, espigas imaturas, ápice vegetativo, folhas jovens e pontas das raízes. Uma observação interessante consistiu na expressão intensa específica à célula mãe de megasporó, implicando uma função neste tecido.

#### 10 **Exemplo 5: Isolamento e clonagem do promotor**

O procedimento para o isolamento do gene é descrito no Manual do usuário para o kit Genome Walker vendido por BD BioSciences (anteriormente Clontech Laboratories, Inc.) Palo  
15 Alto, Calif. DNA genômico proveniente de uma linhagem de milho foi isolado usando-se reagentes Puregene<sup>®</sup> adquiridos de Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN, usado de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi então usado exatamente conforme descrito no Manual de Uso do  
20 GenomeWalker<sup>™</sup> (Clontech PT3042-1). Resumindo, o DNA foi digerido separadamente com as enzimas de restrição DraI, EcoRV, PvuII e StuI, todos cortadores de ponta cega. O DNA foi extraído com fenol, em seguida com clorofórmio, precipitando-se então com etanol. Os adaptadores de  
25 GenomeWalker<sup>™</sup> foram ligados nas extremidades do DNA restrito. Refere-se ao DNA resultante como DL 1-4, respectivamente.

Para o isolamento do promotor 419 foram projetados primers aninhados tendo aproximadamente 250 pb e 150 pb,

respectivamente, 3' de ATG de 419. Estes foram usadas com cada amostra de DNA (DL 1-4) e os primers GenomeWalker™ adequados em duas séries de PCRs. As combinações de primers e o modo como estas PCR foi conduzida são descritos abaixo:

5        Na primeira série de PCR, foi usado o primer Clontech AP1 (SEQ ID NO: 7) e o primer 1 específico a gene (gsp1) (SEQ ID NO: 8). A PCR foi conduzida em um ciclador térmico modelo PTC-100 com Hot Bonnet® de MJ Research (Watertown, Maine) usando-se reagentes fornecidos juntamente com o kit  
10    GenomeWalker™, exceto que foi usada a mistura de polimerases de 2 DNAs Advantage™, adquirida da mesma empresa, em vez da mistura de polimerases Tth fornecida com o kit. Foram usados os seguintes parâmetros de ciclicização: sete ciclos de 94°C durante 2 segundos, em seguida a 72°C  
15    durante 3 minutos, em seguida 28 ciclos de 94°C por 2 segundos, e 67°C durante 3 minutos. Finalmente as amostras foram mantidas a 67°C durante 7 minutos, em seguida a 4°C até uma análise subsequente. Conforme descrito no Manual do usuário, o DNA proveniente da primeira série de PCR foi  
20    então diluído e serviu como um molde em uma segunda série de PCR usando o primer Clontech AP2 (SEQ ID NO: 9) e gsp2 (SEQ ID NO: 10). Os parâmetros de ciclagem para a segunda série eram: 5 ciclos a 94°C durante 2 segundos, em seguida a 72°C durante 3 minutos, em seguida 20 ciclos a 94°C durante 2  
25    segundos, e a 67°C durante 3 minutos e finalmente 7 minutos a 67°C. Aproximadamente 8 µL de cada reação foram usados em um gel de agarose a 1,0%, e as faixas foram excisadas e purificadas com o kit Sephaglas™ BandPrep Kit (Amersham Biosciences) e clonadas dentro de um vetor TA (Invitrogen,

San Diego, Calif.). Os clones foram seqüenciados para verificação.

**Exemplo 6: Ensaio transitório de inflorescência**  
**5 feminina**

A indicação inicial da atividade do promotor 3419 foi observada nos ensaios transitórios usando-se um sistema transitório de inflorescência feminina. O promotor 419 de  
10 949 pb e o 5' UTR de 152 pb (SEQ ID NO: 1) foram operacionalmente conectados na frente tanto do gene de beta-glicuronidase (doravante GUS) e do gene de Zs-Amarelo (BD BioSciences). As construções foram também preparados ligando operacionalmente o íntron AdhI 3' do promotor 419/UTR e 5'  
15 do gene de GUS ou de Zs-Amarelo.

As espigas provenientes de uma linhagem de milho extremamente transformável foram colhidas da estufa no estágio do desenvolvimento indicado (a partir de 0 a 2 dias após a polinização). A casca teve a superfície esterilizada  
20 com etanol a 70% e as folhas foram retiradas, revelando as inflorescências femininas ligadas à espiga. O comprimento da espiga foi medido e os explantes foram preparados dentro de uma hora após a colheita da espiga. Foram preparadas placas de explantes destacados de inflorescência feminina usando-se  
25 fragmentos de 4 cm de 10 a 15 inflorescência feminina (cortados a 1 cm da base da inflorescência), colocadas na superfície do meio. Os explantes de inflorescência feminina fixados eram constituídos por fragmentos de 1 cm de sabugo dividido ao meio, sendo as inflorescências femininas

aparadas até 5 cm a partir da base da inflorescência. O meio consistia em agar em água a 0,7%, com ou sem ácido ascórbico a 10 mg/L. Os explantes foram bombardeados dentro de duas horas após a colheita usando-se um sistema PDS-1000/He (DuPont Company, Wilmington, Del., USA). Para cada construção de marcador usada nestes experimentos, precipitou-se 5 µL de DNA (1 µg/µL) com 50 µL de CaCl<sub>2</sub> a 2,5M e 20 µL de espermidina a 0,1M em 50 µL de partículas de tungstênio (1,0 µm a uma densidade de partículas de 15 mg/mL).

Aproximadamente 600 ng de DNA por detonação foram fornecidos a 650 psi sob 27 polegadas de Hg de vácuo, a uma distância de 5 cm da placa de detenção. Duas a três réplicas por espiga e uma a duas espigas por estágio desenvolvimental foram tratadas para cada construção. As placas foram lacradas depois do bombardeio e armazenadas a 28-30°C no escuro durante 48 horas. Quarenta e oito horas depois do bombardeio, os explantes foram examinados para a expressão transgênica. Os explantes bombardeados com construções de GUS foram tingidos com tampão de McCabe contendo DMSO e x-glicuronidase (McCabe, D.E. et al. (1988) Bio/Technology 6: 923-926) durante 24 horas à temperatura ambiente antes de se fazerem as observações. Os explantes bombardeados com ZsAmarelo (Clontech) foram observados com grande amplificação usando-se um microscópio Leica ligado a uma fonte de luz de xenônio, usando-se um filtro 30 para ZsAmarelo. Foram obtidas micrografias que representavam a resposta observada média.

As inflorescências femininas destacadas foram bombardeadas com ubi:GUS usando-se um protocolo padrão e colocados sobre agar em água a 0,7%, mais ou menos 10 mg/L de ácido ascórbico. Depois de 48 horas sobre o meio, as

5 inflorescências femininas foram tingidas com Tampão de McCabe contendo DMSO e x-glucuronidase durante 24 horas antes de se fazerem as observações. O número total de manchas azuis por inflorescência foi registrado para todas as inflorescências femininas por placa, quatro placas por

10 tratamento. O número médio de manchas azuis por inflorescência destacada era significativamente maior usando-se meio de ágar me água contendo o ácido ascórbico (11 manchas por inflorescência), em comparação com as inflorescências femininas destacadas (3,5 manchas por

15 inflorescência). As manchas tinham também tamanhos maiores e eram de aparência mais escura.

Deixando-se as inflorescências femininas ligadas ao sabugo no meio de ágar em água contendo ácido ascórbico verificou-se um aumento significativo na transformação em

20 relação as inflorescências femininas destacadas (19 a 23 manchas por inflorescência contra 11 manchas por inflorescência). No entanto, a comparação entre inflorescências femininas aparadas e não aparadas, ou a adição de sacarose a 1,0% ao meio não apresentou nenhuma

25 alteração significativa na transformação de inflorescência feminina ligadas ao sabugo.

#### **Exemplo 7: Teste dos fragmentos truncados do promotor**

Três fragmentos truncados do promotor 419 foram usados para análises transitórias. Em cada caso, o fragmento de promotor foi fundido a 5' da região 5' UTR de 419 + proteína fluorescente ZsAmarelo. Estas construções de DNA foram  
5 bombardeadas com plasmídeos. O promotor 419 de comprimento total tendo 949 pb a montante de 5'UTR, foi analisado, assim como 3 fragmentos truncados de 602 pb (TR1, SEQ ID NO: 4), 350 pb (TR2, SEQ ID NO: 5), e 129 pb (TR3, SEQ ID NO: 6). Este teste foi conduzido para se demonstrar que os  
10 fragmentos do promotor eram funcionais. Os bombardeios foram conduzidos conforme descrito nos métodos abaixo em três experimentos separados com resultados análogos de cada vez. Os resultados de um experimento representativo são mostrados na tabela 1. O controle negativo que consistia na construção  
15 de ZsAmarelo sozinho, continha a sequência de codificação para a proteína fluorescente sem nenhum elemento regulador conhecido 5'. Um outro controle negativo consistia em um explante que não tinha sido atingido com nenhuma construção. A versão TR3 do promotor 419 proporcionou somente 7% da  
20 expressão do promotor de comprimento total provido.

#### Materiais e Métodos

Espigas não polinizadas de sete a dez centímetros de uma linhagem de milho extremamente transformável foram colhidas da estufa. A casca teve a superfície esterilizada  
25 com etanol a 70% e foi descascado, revelando as inflorescências femininas ligadas à espiga. O comprimento da espiga foi medido e os explantes foram preparados dentro de uma hora depois da colheita da espiga. As placas de explantes de inflorescência feminina ligados consistiam em

fragmentos de 1 cm do sabugo com inflorescência feminina fixados aparados até 5 cm a partir da base da inflorescência. Os explantes foram colocados em um meio de agar em água a 0,7% contendo 10 mg/L de ácido ascórbico.

5        Para cada construção marcadora usada nestes experimentos fez-se precipitar 5  $\mu$ L de DNA + água com 50  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  a 2,5M e 20  $\mu$ L de espermidina a 0,1M sobre 50  $\mu$ L de partículas de tungstênio (1,0  $\mu$ m com uma densidade de partículas de 15 mg/mL). Aproximadamente  $3,8 \times 10^8$  nmol de  
10 DNA foi usado por detonação, fornecido ao tecido a 650 psi (4481,59 kPa), a 5 cm da placa de detenção. Para cada experimento, foram usadas 3 a 4 réplicas por espiga para cada construção. As placas foram lacradas depois do bombardeio e armazenadas a 28-30°C no escuro durante 48 a 72  
15 horas.

#### Observações e Coleta de Dados

Quarenta e oito a 72 horas depois do bombardeio, os explantes foram examinados para a expressão transgênica. Os explantes bombardeados com ZsYellow foram observados com  
20 alta ampliação usando-se um microscópio Leica ligado a uma fonte de luz de xenônio usando-se um filtro de ZS Yellow (500/530). As micrografias foram tiradas com tempos de exposição em que não ocorria nenhuma fluorescência de fundo de controle. O número de manchas foi contado e registrado  
25 uma resposta média.

**Tabela 1: Resultados do ensaio por Bombardeio para os fragmentos truncados de promotor**

| Construção         | Contagem<br>estimada<br>de<br>manchas | Número de<br>floretes<br>que<br>expressam | Total<br>estimado de<br>floretes<br>bombardeados | No. médio<br>de manchas<br>por florete<br>bombardeado | No. médio<br>de manchas<br>por<br>construção | % de<br>expressão de<br>comprimento<br>total (FL) |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 419 FL             | 33                                    | 16                                        | 18                                               | 29,3                                                  | 25,8                                         | 100                                               |
| SEQ ID NO:         | 49                                    | 11                                        | 15                                               | 35,9                                                  |                                              |                                                   |
| 1                  | 41                                    | 4                                         | 8                                                | 20,5                                                  |                                              |                                                   |
|                    | 23                                    | 9                                         | 12                                               | 17,3                                                  |                                              |                                                   |
| 419 TR1            | 6                                     | 7                                         | 9                                                | 4,7                                                   | 10,0                                         | 26                                                |
| SEQ ID NO:         | 24                                    | 6                                         | 8                                                | 18,0                                                  |                                              |                                                   |
| 4                  | 10                                    | 11                                        | 14                                               | 7,9                                                   |                                              |                                                   |
|                    | 14                                    | 10                                        | 15                                               | 9,3                                                   |                                              |                                                   |
| 419 TR2            | 2                                     | 5                                         | 9                                                | 1,1                                                   | 2,2                                          | 12                                                |
| SEQ ID NO:         | 4                                     | 9                                         | 12                                               | 3,0                                                   |                                              |                                                   |
| 5                  | 2                                     | 8                                         | 13                                               | 1,2                                                   |                                              |                                                   |
|                    | 5                                     | 8                                         | 11                                               | 3,6                                                   |                                              |                                                   |
| 419 TR3            | 2                                     | 9                                         | 12                                               | 1,5                                                   | 1,7                                          | 7                                                 |
| SEQ ID NO:         | 3                                     | 4                                         | 9                                                | 1,3                                                   |                                              |                                                   |
| 6                  | 4                                     | 7                                         | 10                                               | 2,8                                                   |                                              |                                                   |
|                    | 2                                     | 5                                         | 9                                                | 1,1                                                   |                                              |                                                   |
| ZS Amarelo         | 0                                     | 10                                        | 10                                               | 0,0                                                   | 0,3                                          | 1                                                 |
| somente            | 0                                     | 9                                         | 9                                                | 0,0                                                   |                                              |                                                   |
|                    | 0                                     | 11                                        | 11                                               | 0,0                                                   |                                              |                                                   |
|                    | 1                                     | 11                                        | 11                                               | 1,0                                                   |                                              |                                                   |
| Não<br>bombardeado | 0                                     | 0                                         | n/a                                              | n/a                                                   | 0,0                                          | 0                                                 |



### **Exemplo 8: Transformação de Milho por Bombardeio de partículas e Regeneração de Plantas Transgênicas**

Foram bombardeados embriões imaturos de milho,  
5 provenientes de plantas de casa de vegetação doadoras, com  
uma molécula de DNA contendo um promotor da invenção ligado  
operacionalmente a um gene de interesse. Um marcador de  
seleção é provido no mesmo vetor de transformação, ou  
alternativamente, o gene de marcador de seleção é provido em  
10 uma molécula de DNA separada. A transformação é conduzida do  
seguinte modo. As receitas dos meios seguem abaixo.

#### **Preparação do Tecido Alvo**

15 As espigas são descascadas e têm a superfície  
esterilizada em alvejante Clorox<sup>TM</sup> a 30% acrescido de  
detergente Micro a 0,5% durante 20 minutos, sendo então  
enxaguadas duas vezes com água estéril. Os embriões imaturos  
são excisados e colocados com o lado do eixo do embrião  
20 voltado para baixo (lado do escutelo voltado para cima), 25  
embriões por placa sobre meio 560Y durante 4 horas  
alinhando-se então dentro de uma zona alvo de 2,5 cm em  
preparação para o bombardeio.

#### **25 Preparação de DNA**

Prepara-se um vetor de plasmídeo compreendendo uma  
seqüência de promotor da invenção. O vetor contém ainda um  
gene marcador de seleção PAT acionado por um promotor de

CAMV35S e inclui um terminador de CAMV35S. Opcionalmente o marcador de seleção pode residir em um plasmídeo separado. Uma molécula de DNA compreendendo uma sequência de promotor da invenção assim como um marcador de seleção PAT é precipitado sobre grânulos de tungstênio de 1,1  $\mu\text{m}$  (diâmetro médio) usando-se um procedimento de precipitação por  $\text{CaCl}_2$  conforme segue:

- 100  $\mu\text{L}$  de partículas de tungstênio preparado em água
  - 10 10  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}$ ) de DNA em tampão de Tris EDTA (1  $\mu\text{g}$  total de DNA)
  - 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  a 2,5M
  - 10  $\mu\text{L}$  de espermidina a 0,1M
- Cada reagente é acrescentado em sequência a uma
- 15 suspensão de partículas de tungstênio, mantendo-se o mesmo sobre um vortex multitubos. A mistura final é rapidamente sonicada e deixa-se que se incube com uma rotação em ciclone constante durante 10 minutos. Depois do período de precipitação, rapidamente centrifugam-se os tubos, remove-se
- 20 o líquido, lava-se com 500 mL de etanol a 100% e centrifuga-se durante 30 segundos. Novamente remove-se o líquido e acrescentara-se 105  $\mu\text{L}$  de etanol a 100% ao pélete de partículas de tungstênio final. Para o bombardeio com pistola de partículas, as partículas de tungstênio/DNA são
- 25 rapidamente sonicadas e 10  $\mu\text{L}$  pingados sobre o centro de cada macrocarreador e colocadas para secar durante aproximadamente 2 minutos antes do bombardeio.

Tratamento com Pistola de Partículas

As placas de amostras são bombardeadas a nível #4 na pistola de partículas #HE34-1 ou #HE34-2. Todas as amostras receberam um único impacto a 650 psi (4481,59 kPa) com um total de dez alíquotas tomadas de cada tubo de partícula  
5 preparadas/DNA.

#### Tratamento Subseqüente

Depois do bombardeio, os embriões são mantidos em meio  
10 560 Y durante 2 dias, sendo então transferidos para meio de seleção 560R contendo 3 mg/L de Bialafos, e sub-cultivados a cada 2 semanas. Depois de aproximadamente 10 semanas de seleção, os clones de calo resistência a seleção são transferidos para meio 288J para iniciar a regeneração da  
15 planta. Depois da maturação somática do embrião (2-4 semanas), os embriões somáticos bem desenvolvidos são transferidos para o meio para germinação e transferidos para um recinto de cultura iluminado. Aproximadamente 7-10 dias mais tarde, as plântulas em desenvolvimento são transferidas  
20 para meio 272V isento de hormônio em tubos durante 7-10 dias até as plântulas estarem bem estabelecidas. As plantas são então transferidas para inserções em bandejas (equivalente a um vaso de 2,5" contendo solo para vasos e cultivadas durante 1 semana em uma câmara de cultura, sendo  
25 subseqüentemente cultivadas durante outras 1-2 semanas na casa de vegetação, sendo então transferidas para vasos clássicos 600 (1,6 galões) e cultivadas até maturidade. As plantas são monitoradas e recebem uma contagem para a expressão por ensaios conhecidos na técnica, tais como, por

exemplo, imunoensaios e western blot com um anticorpo que se liga à proteína de interesse.

#### Bombardeio e Meios de Cultura

5

O meio de bombardeio (560Y) compreende 4,0 g/L de sais basais N6 (SIGMA C- 1416), 1,0 mL/L de Eriksson's Vitamin Mix (1000 x SIGMA-1511), 0,5 mg/L de tiamina HCl, 120,0 g/L de sacarose, 1,0 mg/L de 2,4-D, e 2,88 g/L de L-prolina (levado ao volume com H<sub>2</sub>O dl depois do ajuste do pH para 5,8 com KOH); 2,0 g/L de Gelrite™ (acrescentado depois de se ter levado ao volume com H<sub>2</sub>O dl); e 8,5 mg/L de nitrato de prata (acrescentado depois da esterilização do meio e resfriamento até a temperatura ambiente). O meio de seleção

15 (560R) compreende 4,0 g/L de sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0 mL/L de Eriksson's Vitamin Mix (1000 x SIGMA-1511), 0,5 mg/L de tiamina HCl, 30.0 g/L de sacarose e 2,0 mg/L 2,4-D (levado ao volume com H<sub>2</sub>O dl depois de se ter ajustado o pH para 5.8 com KOH); 3,0 g/L Gelrite™ (acrescentado depois de se ter chegado ao volume com H<sub>2</sub>O dl); e 0,85 mg/L de nitrato de prata e 3,0 mg/L Bialafos (ambos acrescentados depois de se ter esterilizado o meio e se ter resfriado até a temperatura ambiente).

20

O meio de regeneração de planta (288J) compreende 4,3

25 g/L de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 mL/L de solução de estoque de vitaminas em MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,02 g/L de tiamina HCl, 0,10 g/L de piridoxina HCl, e 0,40 g/L de glicina levado a volume com H<sub>2</sub>O deionizada) (Murashige e Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 mg/L

de mio-inositol, 0,5 mg/L de zeatina, 60 g/L de sacarose, e 1,0 mL/L de ácido abscísico a 0,1 mM (levado ao volume com H<sub>2</sub>O deionizada depois de se ter ajustado o pH para 5,6); 3,0 g/L de Gelrite™ (acrescentado depois de se levar ao volume com H<sub>2</sub>O deionizada); e 1,0 mg/L de ácido indolacético e 3,0 mg/L Bialafos (acrescentado depois da esterilização do meio e do resfriamento até 60°C). O meio isento de hormônio (272V) compreende 4,3 g/L de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 mL/L de solução de estoque de vitaminas MS (0,100 g/L de ácido nicotínico, 0,02 g/L de tiamina HCl, 0,10 g/L de piridoxina HCl, e 0,40 g/L de glicina levada a volume com H<sub>2</sub>O deionizada), 0,1 g/L de mio-inositol, e 40,0 g/L de sacarose (levado ao volume com H<sub>2</sub>O deionizada depois de se ter ajustado o pH para 5,6); e 6 g/L de Bacto-agar (acrescentado depois de se levar ao volume com H<sub>2</sub>O deionizada), e esterilizado e resfriado até 60°C.

### **Exemplo 9: Transformação do Milho Mediada por *Agrobacterium* e Regeneração de Plantas Transgênicas**

20

Para a transformação do milho mediada por *Agrobacterium* com uma sequência de promotor da invenção, foi empregado o método de Zhao (patente US 5.981.840 e publicação de patente PCT WO98/32326; cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência). Resumindo, embriões imaturos foram isolados do milho e colocados em contato com uma suspensão de *Agrobacterium* em condições em que a bactéria seria capaz de transferir a sequência de promotor da invenção para pelo menos uma célula de pelo menos um dos

embriões imaturos (etapa 1: a etapa de infecção). Nesta etapa, os embriões imaturos foram imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para a iniciação da inoculação. Os embriões foram co-cultivados durante um tempo com o *Agrobacterium* (etapa 2: a etapa de co-cultivo). Os embriões imaturos foram cultivados em meio sólido depois da etapa de infecção. Depois do período de co-cultivo, foi conduzida uma etapa opcional de "repouso". Nesta etapa de repouso, os embriões foram incubados na presença de pelo menos um antibiótico conhecido como inibindo o crescimento de *Agrobacterium* sem a adição de um agente seletivo para transformantes vegetais (etapa 3: etapa de repouso). Os embriões imaturos foram cultivados sobre meio sólido com antibiótico, mas sem um agente seletor, para a eliminação de *Agrobacterium* e para uma fase de repouso para as células infectadas. Em seguida, os embriões inoculados foram cultivados sobre meio contendo um agente seletivo e o calo transformado em crescimento foi recuperado (etapa 4: a etapa de seleção). Os embriões imaturos foram cultivados sobre meio sólido com um agente seletivo resultando no crescimento seletivo de células transformadas. O calo foi então regenerado em plantas (etapa 5: a etapa de regeneração), e calos cultivados sobre meio seletivo foram cultivados sobre meio sólido para regenerar as plantas.

25

**Exemplo 10: Atividade transgênica estável do promotor "419" e 5' UTR (SEQ ID #1) no milho**

A fim de se determinar a atividade temporal e espacial do promotor 419 acrescido de 5'UTR (SEQ ID NO: 1) em tecido diferenciado em desenvolvimento foram introduzidas duas construções de expressão GUS (GUS1 e GUS2) contendo o  
5 promotor 419 e 5'UTR separadamente em uma linhagem extremamente transformável do milho, usando-se *Agrobacterium* (veja Exemplo 9): Uma das duas construções (GUS2) continha o íntron ADHI do milho. A construção UBI:GUS foi usada como controle.

10 Aproximadamente 20 eventos T0 do calo foram gerados usando-se cada construção. Embriões somáticos foram de tal modo escolhidos que fossem regeneradas por evento três plantas, pressupostamente clonais. Para a maioria dos eventos uma planta teve uma amostra tirada de modo  
15 destrutivo no estágio V10 (pré-floração), um no R1 (de floração) e um foi auto-polinizado para a produção de sementes T1. Foram conduzidos ensaios histoquímicos e bioquímicos (veja métodos de ensaio MUG, abaixo).

A atividade do promotor 419 no estágio V10 é  
20 apresentada na Figura 1 em termos de atividade MUG. Em todos os casos, a atividade MUG é apresentada como uma taxa de acúmulo de produto normalizada para o teor de proteína do ensaio. As taxas mostradas na Figura 1 são médias de amostras tiradas de tantos dos 20 eventos gerados por  
25 construção quantos eram possíveis, geralmente de 15-18; as barras de erro representam erro padrão.

Em comparação com a expressão acionada por promotor de ubiquitina bem caracterizado constitutivo do milho, o promotor 419 é muito ativo na bainha da folha, na língula e

na aurícula, com níveis muito inferiores na lâmina da folha. a presença do íntron ADHI do milho resultou em uma atividade acentuada do promotor, variando de aproximadamente 0,5 a 3 vezes, dependendo do tecido.

5        A expressão das construções GUS1 e GUS2 no estágio R1 (de floração) é observada na Figura 2. A expressão neste estágio ocorre principalmente nos tecidos da língula, das cascas e do caule.

10        A análise de T1 quanto a atividade do promotor 419 se concentrou na construção GUS contendo o íntron ADH1 devido à acentuação observada neste material a partir de experimentos de expressão anteriores. As amostras de 2 ou 3 plantas T1 (isto é, irmãs) provenientes de 3 ou 4 eventos T0 diferentes que expressavam foram testadas nos estágios V10, R1 e  
15        durante a maturação dos grãos. Foram observados altos níveis de atividade de promotor 419 na raiz, no nó do caule, na bainha da folha e na junta da folha (aurícula e língula juntas) no estágio V10 conforme mostrado na Figura 3. No  
estágio r1, conforme mostrado na Figura 4, a atividade do  
20        promotor é caracterizada por expressão forte no nó do caule, na bainha da folha e na raiz. Quando analisado por evento, observa-se alguma variabilidade entre eventos e plantas irmãs na geração T1.

25        A atividade do promotor 419 no tecido reprodutor foi determinada histoquimicamente. Nos cachos pré-meióticos contendo a construção GUS2, as paredes das anteras se tingem de azul e o tecido das glumas circundante não se tingem. No desprendimento de pólen, o padrão é invertido. As glumas se tingem com uma cor escura. Nenhuma expressão foi observada



nas anteras nem no pólen. A atividade de promotor 419 em órgãos femininos no estágio R1 é restrita as inflorescências femininas, aumentando a níveis muito altos na base da inflorescência, nas pontas dos glumes circundantes e em  
5 manchas de tecido do sabugo na periferia do sabugo, na região entre o pedicelo (ou base) de cada ovário. A atividade do promotor nos grãos em desenvolvimento atinge máximos ao redor de 21 dap e é restrita ao pericarpo na base do grão.

10

#### Protocolos de Ensaio MUG

Amostras de tecido foram coletadas em tubos de microtitulação e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia do ensaio. No  
15 dia do ensaio, acrescentou-se a cada tubo 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (fosfato de sódio a 50mM, EDTA a 10mM, Triton a 1% e beta-mercapto-etanol a 0,07 %) e um BB de 1/16" (0,16 cm). Depois do tecido ter sido triturado durante 60 segundos a 800 golpes por minuto, coletou-se aproximadamente 150  $\mu\text{L}$   
20 depois de 15 minutos de centrifugação a 5200 rpm. Os ensaios MUG em placas de microtitulação foram conduzidos em duplicata para cada extrato de amostras usando-se um volume de reação de 100  $\mu\text{L}$  contendo 25  $\mu\text{L}$  do extrato e MUG a 1mM (Sigma) para cada ponto no tempo. As placas foram incubadas  
25 em Fluorskan Ascent<sup>®</sup> FL (Thermo Labsystems) durante 55 minutos, em que as reações foram interrompidas depois de 10, 25 e 55 minutos com o tampão de interrupção ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 0,2M) e a fluorescência para todas as amostras foi lida depois do ponto no tempo de 55 minutos (filtro ajustado: 355 nm de

excitação, 460 nm de emissão). A concentração de MUG foi determinada por uma curva padrão contendo seis padrões de MU preparados em água. A atividade de GUS foi calculada tirando-se a média da inclinação da produção de MU a partir de reações das amostras. Veja, por exemplo, Gallagher, S. R. (1992) GUS Protocols. Using the GFUS gene as a Reporter of Gene expression. (Boston: Academic Press, p. 221).

As concentrações de proteína foram determinadas usando-se o kit Bio-Rad Bradford Protein Assay kit (Bio-Rad) misturando-se 1 µL de extrato de amostras em um volume de reação de 200 µL, e fazendo-se a leitura em um espectrofotômetro padrão, juntamente com padrões de proteína de BSA. As amostras foram preparadas para incidir dentro dos limites lineares do ensaio.

Todas as publicações e pedidos de patentes mencionados no presente relatório são indicadores do nível dos versados na técnica a que esta invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de patentes são incorporados ao presente documento a título de referência na mesma medida em que seriam se cada publicação individual ou pedido de patente individual tivesse sido específica e individualmente indicada ou indicado como sendo incorporado ao presente documento a título de referência.

Embora a invenção anterior tenha sido descrita em alguns detalhes como ilustração e exemplo para fins de clareza da compreensão, será obvio que certas mudanças e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações em anexo.

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Requerente: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, SEMENTE, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL, MÉTODO DE EXPRESSÃO SELETIVA

<130> Referência do Documento: 1906-PCT

<150> No. do Pedido de Prioridade: 60/729,772

<151> Data de depósito do Pedido de Prioridade: 24-10-2005

<160> Quantidade de SEQ ID Nos.: 11

<170> Software: FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> SEQ ID No: 1

<211> Comprimento: 1101

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Zea mays

<220> Características:

<221> Nome/chave: misc\_feature

<222> Localização: (0)...(0)

<223> Outras informações: promotor 419 com região 5' não traduzida

<400> Sequência: 1

```
tcgacggccc ggtgctctg gctggacggt ccgccagtgg caacactttc ttcttgtctt 60
ggacttttgct tgatactcgt tgatcttcac atatggtctt cttaatgtct tcctttgagg 120
ttttgcttcc tcaatgcctt agtccaagtc gttttagcat catactacaa acacaaaccc 180
tatcaatcac attagttcac gggctatggt gataatcaaa catcaaaatc aattagtcaa 240
atgggtgagg tccatttttc ttacatatcc gacggctgtc gctagggccg taggacttaa 300
ctgttacttt cgacggctac taggtaccgt cggatataac atagctgtcg acggtttctt 360
acaaagtcgt cgtacatttc ctgtttttatt gttttgggga ggggctgggc agttgcagtg 420
acgatataga tttgacgttg acaaagatac acgtagaaag tagaataatt atattccacg 480
gtggccggtc cctgctttgt gcacgttgct attttttttt gaaaatattg tgctgtttgg 540
ttcacatatt ggtaacgtaa tgggtaaccg ataacgttaa atcatatttg tttagtttaa 600
ccgtaatcga tagtacacta taaaatggat accgccttat ttaaatttgt tatcaccggt 660
attcaagtat gaatcattat cattatcatt tacgttatat ttcgtgaacc caaagacacc 720
tacgtggttg tgttatctta attgtcacgt actcccaacc accatgttca gtacgaatgt 780
catgtggaga aagaagcgtc tagctaccta cctaccgcga ccgaattgaa cacagtaata 840
cattccaata atcgcgtcac tgtacgtgaa gcagcgtgta tcacgttgga tctaactacta 900
taaataccac caggcttcaa gcgtccctcc tcaactccaa ctccaaagcc aacaaacaga 960
gctccaactc agaaagcatc cgtcccttgg cagcagcaac aagctactag ctatgtgtgt 1020
ttagagcgag cgagggaaaa aaaagaaaac atctaagata tactccatca tcttcgtttg 1080
attagccgcg ccagtaaagc c                                     1101
```

<210> SEQ ID No: 2

<211> Comprimento: 152

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Zea mays

<220> Características:

<221> Nome/chave: misc\_feature  
 <222> Localização: (0)...(0)  
 <223> Outras informações: região 5' não traduzida do promotor 419

<400> Sequência: 2

```
caacaaacag agctccaact cagaaagcat ccgtcccttg gcagcagcaa caagctacta 60
gctatgtgtg tttagagcga gcgaggga aaagaagaaa catctaagat atactccatc 120
atcttcgttt gattagcccg ccagtaaaag cc                                     152
```

<210> SEQ ID No: 3  
 <211> Comprimento: 949  
 <212> Tipo: DNA  
 <213> Organismo: Zea mays

<220> Características:  
 <221> Nome/chave: misc\_feature  
 <222> Localização: (0)...(0)  
 <223> Outras informações: promotor 419 sem a região 5' não traduzida

<400> Sequência: 3

```
tcgacggccc ggtgctctgg gctggacggt ccgccagtgg caacactttc ttcttgtctt 60
ggacttttgc tgatactcgt tgatcttcac atatggtctt cttaatgtct tcctttgagg 120
ttttgcttcc tcaatgcctt agtccaagtc gttttagcat catactacaa acacaaaccc 180
tatcaatcac attagtccac gggctatggt gataatcaaa catcaaaatc aattagtcaa 240
atgggtgagg tccatttttc ttacatatcc gacggctgtc gctagggccg taggacttaa 300
ctgttacttt cgacggctac taggtaccgt cggatataac atagctgtcg acggtttctt 360
acaaagtcgt cgtacatttc ctgttttatt gttttgggga ggggctgggc agttgcagt 420
acgatataga tttagcgttg acaaagatac acgtagaaag tagaataatt atattccacg 480
gtggccgttc cctgctttgt gcacgttgct attttttttt gaaaatattg tgctgtttgg 540
ttcacatatt ggtaacgtaa tgggtaaccg ataacgttaa atcatatttg ttttaagttaa 600
ccgtaatcga tagtacacta taaaatggat accgccttat ttaaatttgt tatcaccggt 660
attcaagtat gaatcattat cattatcatt tacgttatat ttcgtgaacc caaagacacc 720
tacgtggttg tggtatctta attgtcacgt actcccaacc accatgttca gtacgaatgt 780
catgtggaga aagaagcgtc tagctaccta cctaccgcga ccgaattgaa cacagtaata 840
cattccaata atcgcgtcac tgtacgtgaa gcagcgtgta tcacgttgga tctaactacta 900
taaataccac caggcttcaa gcgtccctcc tcaactccaa ctccaaagc          949
```

<210> SEQ ID No: 4  
 <211> Comprimento: 602  
 <212> Tipo: DNA  
 <213> Organismo: Zea mays

<220> Características:  
 <221> Nome/chave: misc\_feature  
 <222> Localização: (0)...(0)  
 <223> Outras informações: truncagem de 602 pb do promotor 419.

<400> Sequência: 4

```
tcgacggttt cttacaaagt cgctcgtaac ttctgtttt attgttttgg ggaggggctg 60
gtcagttgca gtgacgatag agatttgacg ttgacaaaga tacacgtaga aagtagaata 120
attatatcc acggtggccg ttccctgctt tgtgcacgtt gctatttttt tttgaaaata 180
ttgtgctgtt tggttcacat attggtaacg taatgggtaa ccgataacgt taaatcatat 240
ttgtttaagt taaccgtaat cgatagtaca ctataaaatg gataccgcct tatttaaatt 300
tggtatcacc ggtattcaag tatgaatcat tatcattatc atttacgtta tatttcgtga 360
acccaaagac acctacgtgg ttgtgttatc ttaattgtca cgtactccca accaccatgt 420
```

```
tcagtagcgaa tgtcatgtgg agaaagaagc gtctagctac ctacctaccc gcaccgaatt 480
gaacacagta atacattcca ataatcgcggt cactgtacgt gaagcagcgt gtatcacggt 540
ggatctaaca ctataaatac caccaggctt caagcgctcc tctcactcc aaactccaaa 600
gc 602
```

<210> SEQ ID No: 5  
 <211> Comprimento: 351  
 <212> Tipo: DNA  
 <213> Organismo: Zea mays

<220> Características:  
 <221> Nome/chave: misc\_feature  
 <222> Localização: (0)...(0)  
 <223> Outras informações: truncagem de 350 pb do promotor 419

<400> Sequência: 5  
 aaccgtaatc gatagtagcac tataaaatgg ataccgcctt atttaaattt gttatcacccg 60  
 gtattcaagt atgaatcatt atcattatca tttacgttat atttcgtgaa cccaaagaca 120  
 cctacgtggg tgtgttatct taattgtcac gtactcccaa ccaccatgtt cagtagcaat 180  
 gtcattgtgga gaaagaagcg tctagctacc tacctaccgg caccgaattg aacacagtaa 240  
 tacattccaa taatcgcgtc actgtacgtg aagcagcgtg tatcacgttg gatctaacac 300  
 tataaatacc accaggcttc aagcgctcct cctcactcca aactccaaag c 351

<210> SEQ ID No: 6  
 <211> Comprimento: 129  
 <212> Tipo: DNA  
 <213> Organismo: Zea mays

<220> Características:  
 <221> Nome/chave: misc\_feature  
 <222> Localização: (0)...(0)  
 <223> Outras informações: truncagem de 129 pb do promotor 419

<400> Sequência: 6  
 ccgaattgaa cacagtaata cattccaata atcgcgctcac tgtacgtgaa gcagcgtgta 60  
 tcacgttgga tctaactacta taaataccac caggcttcaa gcgtccctcc tcaactccaaa 120  
 ctccaaagc 129

<210> SEQ ID No: 7  
 <211> Comprimento: 390  
 <212> Tipo: PRT  
 <213> Organismo: Zea mays

<220> Características:  
 <221> Nome/chave: PEPTIDE  
 <222> Localização: (0)...(0)  
 <223> Outras informações: Tradução predita da proteína expressa pelo gene 419 da superfamília GDSL

<400> Sequência: 7  
 Met Gly Thr Asn Tyr Arg Ala Val Ile Ser Leu Val Leu Leu Val Cys  
 1 5 10 15  
 Ile Ala Ser Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ala Glu Thr Asp Val Glu Gln  
 20 25 30  
 Lys Arg Ser Ser Val Pro Leu Met Phe Val Phe Gly Asp Ser Leu Val

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Asp | Val | Gly | Asn | Asn | Asn | Phe | Leu | Pro | Pro | Pro | Ala | Pro | Arg | Ala | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Pro | Tyr | Gly | Ile | Asp | Phe | Pro | Ser | Gly | Thr | Pro | Gly | Ala | Val | Ser |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Gly | Arg | Phe | Thr | Asn | Gly | Tyr | Asn | Leu | Ala | Asp | Leu | Val | Ala | Arg | Arg |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Leu | Gly | Phe | Lys | Met | Ser | Pro | Pro | Ala | Tyr | Leu | Ser | Leu | Thr | Pro | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ser | Lys | Phe | Asp | Leu | Phe | Thr | Cys | Arg | Ile | Gly | Ala | Asn | Tyr | Ala | Ser |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Ile | Leu | Asn | Thr | Thr | Gly | Asn | Gly | Thr | Leu | Thr | Leu |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gln | Lys | Gln | Ile | Thr | Leu | Phe | Ser | Lys | Thr | Lys | Ala | Arg | Met | Ser | Trp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Arg | Cys | Lys | Leu | Ser | Ser | Met | Val | Ser | Arg | Ser | Leu | Phe | Leu | Ile |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | Ala | Gly | Gly | Asn | Asp | Phe | Ser | Ala | Phe | Ser | Glu | Met | Gly | Met | Gly |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Glu | Gln | Asp | Ala | Pro | Ala | Tyr | Ile | Ser | Ser | Met | Val | Ser | Thr | Tyr | Val |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Gln | His | Ile | Asp | Ala | Leu | Tyr | Lys | Leu | Gly | Ala | Arg | Arg | Leu | Gly | Ile |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Leu | Asp | Val | Pro | Ala | Ile | Gly | Cys | Thr | Pro | Gly | Ser | Arg | Val | Pro | Met |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ala | Asn | Gly | Gly | Cys | Asn | Asp | Ala | Ala | Asn | Ser | Met | Ala | Gln | Asn | Phe |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Asn | Arg | Leu | Leu | Arg | Leu | Glu | Val | Ala | Lys | Ala | Val | Ala | Ser | Ser | Met |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Pro | Gly | Met | Lys | Tyr | Ser | Ile | Ala | Ser | Thr | Tyr | Asn | Phe | Val | Thr | Asp |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Leu | Met | Asn | Ser | His | Leu | Val | Ala | Gly | Leu | Arg | Val | Val | Asp | Arg | Ala |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Cys | Cys | Gly | Ser | Gly | Lys | Leu | Asn | Ala | Ala | Val | Met | Cys | Ala | Gln | Pro |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Asn | Thr | Thr | Tyr | Cys | Ser | Asp | Arg | Asp | Asp | Tyr | Met | Phe | Trp | Asp | Met |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Leu | His | Pro | Thr | Gln | Ala | Thr | Asn | Glu | Arg | Gly | Val | Val | Ala | Ile | Phe |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Tyr | Gly | Pro | Gln | Glu | Tyr | Ala | Asp | Pro | Ile | Asn | Phe | Ala | Gln | Leu | Ala |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ala | Ala | Thr | Ala | Asn | Asp | Asp | Asp | Asp | Ile | Asn | Thr | Ala | Met | Thr | Ala |
|     |     | 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Gly | Val | Tyr | Ala | Ala | Ile |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> SEQ ID No: 8

<211> Comprimeto: 22

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Oligonucleotídeo iniciador Clontech AP1

<400> Sequência: 8

gtaatacgaac tcactatagg gc

<210> SEQ ID No: 9  
<211> Comprimento: 26  
<212> Tipo: DNA  
<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Oligonucleotídeo iniciador gsp1 gene específico

<400> Sequência: 9

ccagcgaatc accgaacaca aacatc

26

<210> SEQ ID No: 10  
<211> Comprimento: 19  
<212> Tipo: DNA  
<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações: Oligonucleotídeo iniciador Clontech AP2

<400> Sequência: 10

actatagggc acgcgtggt

19

<210> SEQ ID No: 11  
<211> Comprimento: 26  
<212> Tipo: DNA  
<213> Organismo: Sequência Artificial

<220> Características:

<223> Outras informações Oligonucleotídeo iniciador gsp2 gene específico

<400> Sequência: 11

gcttctgctc aacgtcagtt tcagcg

26

**REIVINDICAÇÕES**

1. Molécula de ácido nucléico isolada caracterizada por compreender uma seqüência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo de:

a) Uma seqüência de nucleotídeo compreendendo a seqüência definida em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6, ou um complemento destas;

b) Uma seqüência de nucleotídeo compreendendo a seqüência promotora vegetal compreendida no Depósito de Patente No. NRRL B-30879, ou um complemento desta;

c) Uma seqüência de nucleotídeo compreendendo um fragmento da seqüência definida em SEQ ID NO:1, na qual a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal, e;

d) Uma seqüência de nucleotídeo compreendendo uma seqüência apresentando pelo menos 90% de identidade de seqüência com a seqüência definida em SEQ ID NO:1, na qual a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

2. Construção de DNA caracterizada por compreender uma seqüência de nucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 operacionalmente ligada a uma seqüência de nucleotídeos heteróloga de interesse.



3. Vetor caracterizado por compreender a construção de DNA da reivindicação 2.

4. Célula vegetal caracterizada por ter estavelmente incorporado em seu genoma a construção de DNA da reivindicação 2.

5. Célula vegetal de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a referida célula vegetal é de uma monocotiledônea.

6. Célula vegetal de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a referida monocotiledônea é milho.

7. Célula vegetal de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a referida célula vegetal é de uma dicotiledônea.

8. Planta caracterizada por ter estavelmente incorporado em seu genoma a construção de DNA da reivindicação 2.

9. Planta de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida planta é uma monocotiledônea.

10. Planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a referida monocotiledônea é milho.

11. Planta de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

5

12. Semente transgênica da planta de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida semente compreende a construção de DNA.

10

13. Planta de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a sequência de nucleotídeo heteróloga de interesse codifica um produto gênico que confere resistência a herbicida, sal, frio, seca, patógeno ou inseto.

15

14. Método para expressar uma sequência de nucleotídeo em uma planta, caracterizado pelo fato de que o referido método compreende introduzir uma construção de DNA em uma planta, a referida construção de DNA compreendendo um promotor e operacionalmente ligada ao referido promotor uma sequência de nucleotídeo heteróloga de interesse, onde o referido promotor compreende uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de:

20

25

a) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência definida em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6, ou um complemento destas;

30

b) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência promotora vegetal compreendida no

Depósito de Patente No. NRRL B-30879, ou um complemento desta;

c) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo um fragmento da sequência definida em SEQ ID NO:1, na qual a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal, e;

d) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NO:1, na qual a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a referida sequência de nucleotídeo heteróloga de interesse é seletivamente expressa em raiz, nós de talo, epiderme interna da bainha foliar, glumas de inflorescência, inflorescência feminina, e em tecido vascular de sabugo abaixo dos pontos de fixação.

16. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

17. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma monocotiledônea.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a referida monocotiledônea é milho.

5        19. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a sequência de nucleotídeo heteróloga de interesse codifica um produto gênico que confere resistência a herbicida, sal, frio, seca, patógeno ou inseto.

10

20. Método para expressar uma sequência de nucleotídeo em uma célula vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método compreende introduzir em uma célula vegetal, uma construção de DNA compreendendo um promotor  
15        operacionalmente ligado a uma sequência de nucleotídeo heteróloga de interesse, onde o referido promotor compreende uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de:

20

a) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência definida em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ou SEQ ID NO: 6, ou um complemento destas;

25

b) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência promotora vegetal compreendida no Depósito de Patente No. NRRL B-30879, ou um complemento desta;

c) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo um fragmento da sequência definida em SEQ ID NO:1,

na qual a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal, e;

d) Uma seqüência de nucleotídeo compreendendo uma seqüência apresentando pelo menos 90% de identidade de seqüência com a seqüência definida em SEQ ID NO:1, na qual a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a referida célula vegetal é de uma monocotiledônea.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a referida monocotiledônea é milho.

23. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a referida célula vegetal é de uma dicotiledônea.

24. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a seqüência de nucleotídeo heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência a herbicida, sal, frio, seca, patógeno ou inseto.

25. Método de expressão seletiva, caracterizado por expressar seletivamente uma seqüência de nucleotídeo em raiz vegetal, nós de talo, epiderme interna da bainha foliar,

glumas de inflorescência, inflorescência feminina, e em tecido vascular de sabugo abaixo dos pontos de fixação, o referido método compreendendo introduzir uma construção de DNA em uma célula vegetal, e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, a referida construção de DNA compreendendo um promotor e uma sequência de nucleotídeo heteróloga operacionalmente ligada ao referido promotor, onde o referido promotor compreende uma sequência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de:

- a) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência definida em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, ou SEQ ID NO: 5, ou um complemento destas;
- b) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência promotora vegetal compreendida no Depósito de Patente No. NRRL B-30879, ou um complemento desta;
- c) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo um fragmento da sequência definida em SEQ ID NO:1, na qual a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal, e;
- d) Uma sequência de nucleotídeo compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NO:1, na qual a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a expressão da referida sequência de nucleotídeo heteróloga altera o fenótipo da planta.

5

27. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a planta é uma monocotiledônea.

10

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a monocotiledônea é milho.

29. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea

15

30. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a sequência de nucleotídeo heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência a herbicida, sal, frio, seca, patógeno ou inseto.

20

Figura 1

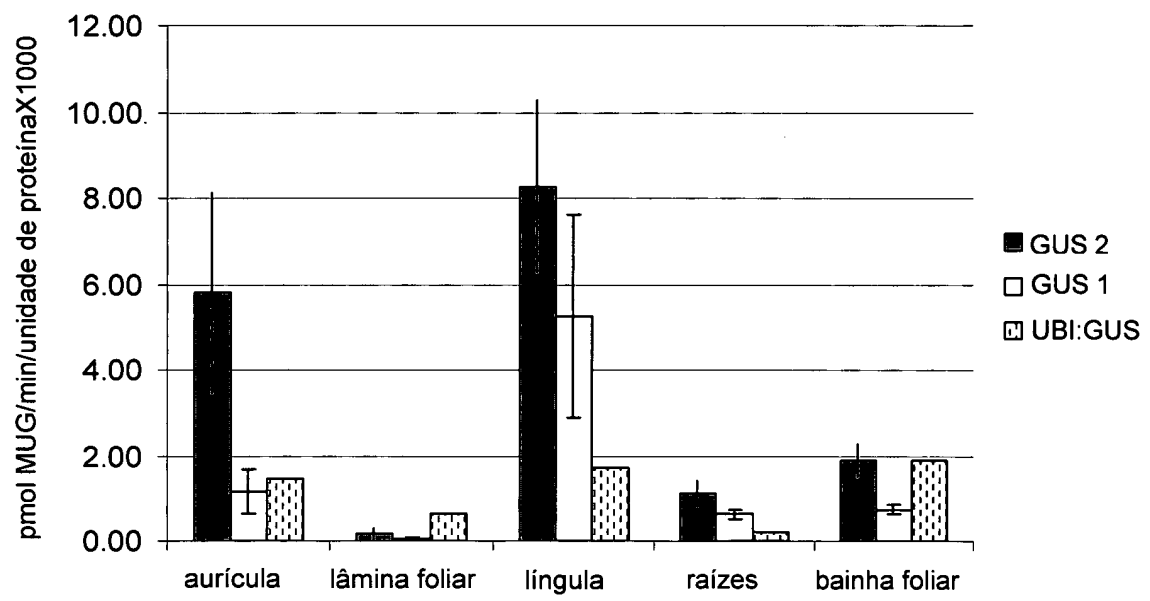




Figura 2

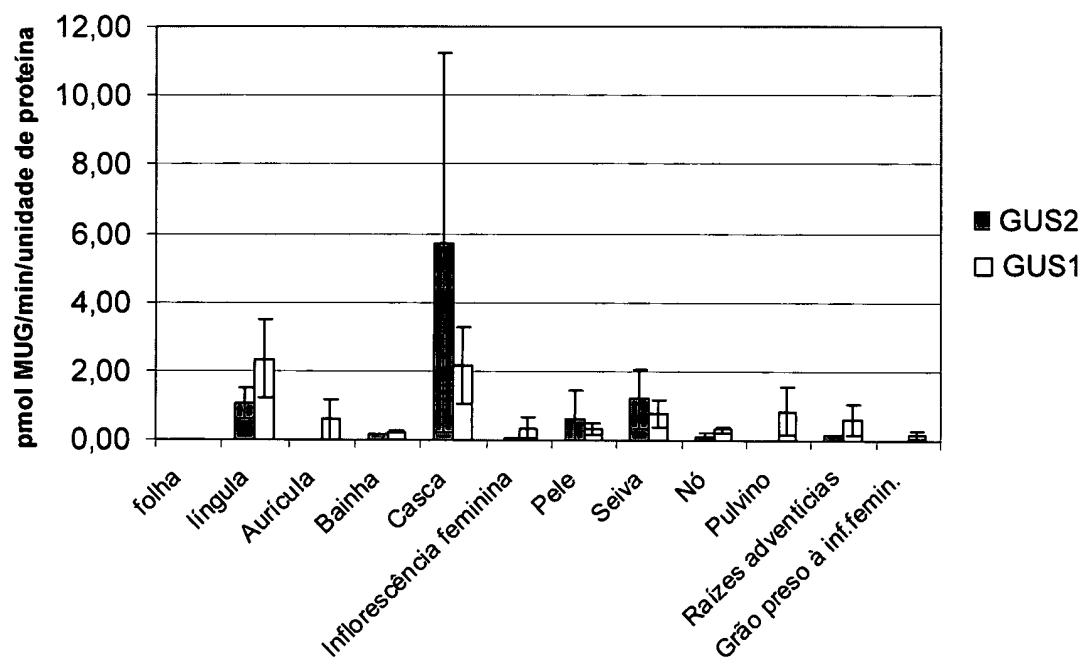


Figura 3

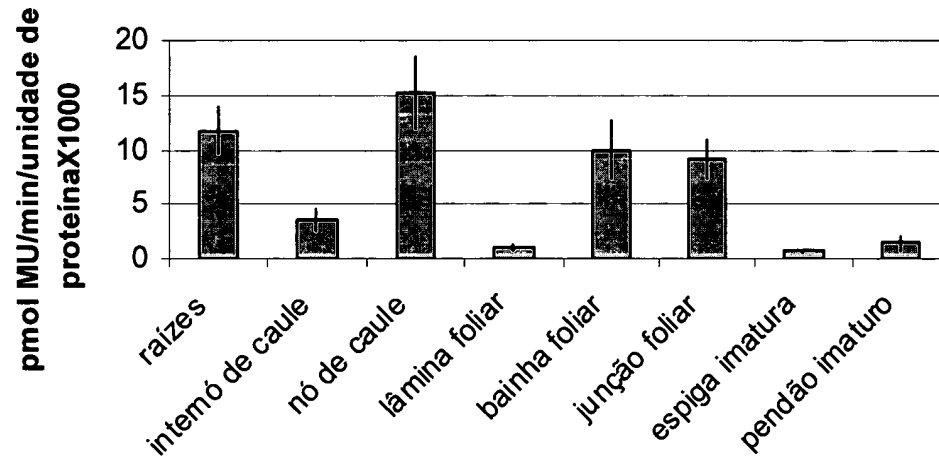
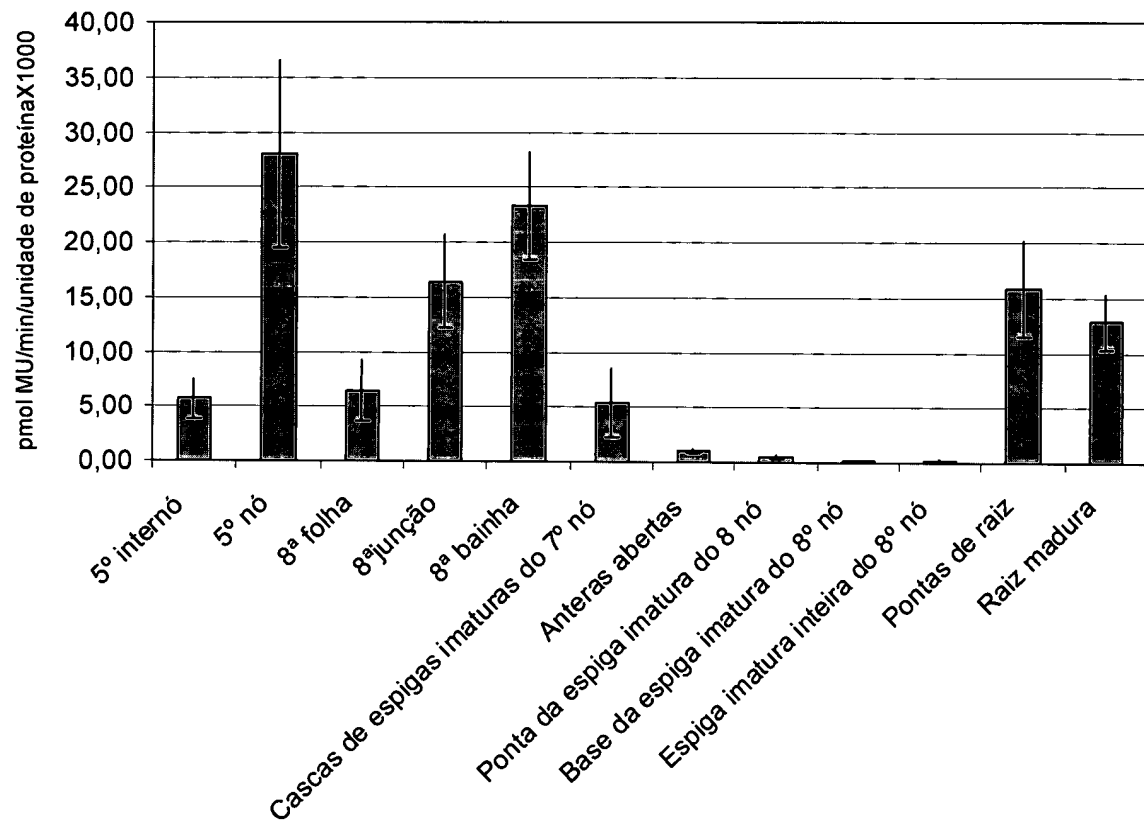


Figura 4



**RESUMO**

**MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA,  
VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, SEMENTE, MÉTODOS PARA  
5 EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEO EM UMA PLANTA, EM UMA  
CÉLULA VEGETAL, MÉTODO DE EXPRESSÃO SELETIVA**

A presente invenção fornece composições e métodos para regular a expressão de seqüências de nucleotídeo heterólogas em uma planta. As composições incluem uma nova seqüência de  
10 nucleotídeo para um promotor tecido-preferencial de milho. É fornecido um método para expressar uma seqüência de nucleotídeo heteróloga em uma planta usando a seqüência promotora aqui apresentada. O método compreende incorporar  
15 estavelmente no genoma de uma célula vegetal uma seqüência de nucleotídeo operacionalmente ligada ao promotor raiz-preferencial da presente invenção e regenerar plantas estavelmente transformadas que expressam a seqüência de nucleotídeo.