



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

(21) BR 102014032977-3 A2



* B R 1 0 2 0 1 4 0 3 2 9 7 7 A

(22) Data do Depósito: 30/12/2014

(43) Data da Publicação: 06/10/2015
(RPI 2335)

(54) Título: PROMTORES UBIQUITINA DE MILHO

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; C12N 15/63; C12N 5/10; A01H 5/00; A01H 5/10

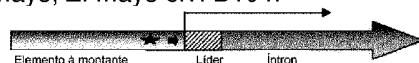
(30) Prioridade Unionista: 31/12/2013 US 61/922,522

(73) Titular(es): DOW AGROSCIENCES LLC

(72) Inventor(es): SANDEEP KUMAR, MANJU GUPTA, TERRY R. WRIGHT, SUSAN M. JAYNE, DOUG A. SMITH, DIAA ALABED

(74) Procurador(es): DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA - API 192

(57) Resumo: PROMTORES UBIQUITINA DE MILHO. A presente invenção refere-se ao promotor Ubiquitina de Zea mays c.v. B73 (Z. mays c.v. B73 Ubi-1), que dirige altos níveis de expressão constitutiva de transgene em plantas. Uso repetido do mesmo promotor Ubi-1 de Z. mays c.v. B73 em construtos multi - genes também pode conduzir ao silenciamento de gene, pelo qual torna produtos transgênicos menos eficazes. São providos elementos promotores reguladores de gene, construtos, e métodos para expressão de um transgene em células de plantas e/ou tecidos de plantas usando elementos reguladores de gene a partir do promotor Ubi-1 de um diferente genótipo de Z. mays, Z. mays c.v. B104.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PRO-MOTORES UBIQUITINA DE MILHO".

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[001] O presente pedido de patente reivindica o benefício sob 35 USC § 119(e) de Pedido Provisório U.S. No. de Série 61/922 522, depositado em 31 de dezembro de 2013, a inteira exposição do qual é aqui incorporada por referência.

Campo da Invenção

[002] Esta invenção é genericamente relacionada ao campo de biologia molecular de planta, e mais especificamente, ao campo de expressão de transgenes em plantas.

Antecedentes

[003] Muitas espécies de plantas são capazes de serem transformadas com transgenes para introdução de características agronomicamente desejáveis. Espécies de plantas são desenvolvidas e/ou modificadas para terem particulares características desejáveis. Geralmente, características desejáveis incluem, por exemplo, aperfeiçoamento de qualidade de valor nutricional, aumento de rendimento, conferir resistência a peste ou doença, aumento de tolerância a seca e tensão, aperfeiçoamento de qualidades horticulturais (por exemplo, pigmentação e crescimento), conferir resistência a herbicida, permitir a produção de compostos e/ou materiais industrialmente úteis a partir da unidade, e/ou permissão de produção de compostos farmacêuticos.

[004] Espécies de plantas transgênicas compreendendo múltiplos transgenes empilhados em um único locus genômico são produzidas via tecnologias de transformação de planta. Tecnologias de transformação de planta resultam na introdução de um transgene em uma célula de planta, recuperação de uma planta transgênica fértil que contém a cópia estavelmente integrada do transgene no genoma de planta, e subsequente expressão de transgene via transcrição e tradução

do genoma de planta resulta em plantas transgênicas que possuem desejáveis características e fenótipos. Entretanto, mecanismos que permitam a produção de espécies de plantas transgênicas para expressarem altamente múltiplos transgenes engenhados como uma pilha de características são desejáveis.

[005] Da mesma maneira, mecanismos que permitam a expressão de um transgene dentro de particulares tecidos ou órgãos de uma planta são desejáveis. Por exemplo, aumentada resistência de uma planta para infecção por patógenos transportados pelo solo pode ser realizada através de transformação de genoma de planta com um gene de resistência a patógeno, de modo que a proteína de resistência a patógeno seja robustamente expressa dentro de raízes da planta. Alternativamente, pode ser desejável expressar um transgene em tecidos de plantas que estão em uma particular fase de desenvolvimento ou crescimento tal como, por exemplo, divisão ou elongação de célula.

[006] São descritos aqui elementos reguladores de promotor Ubi-1 de *Zea luxurians*, incluindo promotores, promotores a montante, 5'-UTRs e íntrons. Além disso, são descritos construtos e métodos que utilizam elementos de regulação gênica.

Sumário

[007] São aqui descritos promotores, construtos e processos para expressão de um transgene em células de plantas e/ou tecidos de plantas. Em uma modalidade, expressão de um transgene comprehende uso de um promotor. Em uma modalidade, um promotor comprehende uma sequência de polinucleotídeos. Em uma modalidade, uma sequência de polinucleotídeos promotora comprehende um promotor – montante, uma região não traduzida 5' (5'-UTR) ou sequência líder, e um ítron. Em uma modalidade, uma sequência de polinucleotídeos promotora comprehende o gene Ubiquitina-1 (Ubi-1). Em uma modalidade, uma sequência de polinucleotídeos promotora comprehende o

gene Ubi-1 de *Zea mays* (*Z. mays*).

[008] Em uma modalidade, um construto inclui um cassete de expressão de gene compreendendo uma sequência de polinucleotídeos promotora que foi obtida do gene Ubi-1 de *Z. mays*. Em uma modalidade, a sequência de polinucleotídeos promotora Ubi-1 de *Z. mays* compreende uma região promotora à montante, 5'-UTR ou sequência líder, e um íntron. Em uma modalidade, um construto inclui um cassete de expressão de gene compreendendo uma sequência de polinucleotídeos promotora obtida de gene Ubi-1 de *Z. mays* fundida a um íntron do gene codificando Proteína Fluorescente Amarela da espécie *Phialidium* (PhiYFP), seguida por uma região 3'-não traduzida (3'-UTR) do gene Peroxidase 5 de *Z. mays* (ZmPer5). A resultante sequência de polinucleotídeo compreende um novo elemento regulador de gene promotor.

[009] Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene inclui um elemento regulador promotor de gene ligado operavelmente a um transgene ou uma sequência codificante heteróloga. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene inclui pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, ou mais transgenes.

[0010] Processos de crescimento de plantas expressando um transgene usando novos elementos reguladores promotores de gene (por exemplo, um promotor à montante, 5'-UTR, e íntron) são aqui mostrados. Processos de cultura de tecidos e células de plantas expressando um transgene usando o novo elemento regulador de promotor de gene também são aqui mostrados. Em uma modalidade, processos como aqui mostrados incluem expressão constitutiva de gene em folhas, raízes, calli, e pólen de planta. Processos de purificação de uma sequência de polinucleotídeo compreendendo o novo elemento regulador de promotor de gene também são aqui mostrados.

Breve Descrição dos Desenhos

[0011] A Figura 1 mostra um promotor novo esquemático compreendendo o gene Ubi-1 de Zea mays c.v. B73. O promotor é compreendido por um elemento à montante, uma 5'-UTR ou sequência líder, e um ítron. O elemento à montante está localizado 5' à montante do Sítio de Início de Transcrição (TSS), indicado pela seta longa. O elemento à montante é compreendido por elementos reguladores, tal como uma caixa TATA, indicada pela seta curta, e um elemento de choque térmico, indicado pela estrela.

[0012] A Figura 2 mostra o mapa de plasmídeo para vetor pDAB105712 compreendendo a sequência promotora amplificada por PCR de gene Ubi-1 de Z. mays c.v.B104.

[0013] A Figura 3 mostra a sequência de polinucleotídeos de promotor de controle de Ubi-1 de Z. mays c.v. B73 (SEQ ID NO: 1) com a região promotora – montante sublinhada, a 5'-UDR / sequência líder sombreada, e a região ítron em caixa inferior.

[0014] A Figura 4 mostra a sequência de polinucleotídeos de promotor de Ubi-1 de Z. mays c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) com a região promotora – montante sublinhada, a 5'-UDR / sequência líder sombreada, e a região ítron em caixa inferior.

[0015] A Figura 5 mostra o alinhamento de sequência de polinucleotídeos das regiões promotoras – montante de Z. mays c.v. B104 (SEQ ID NO: 4) comparado à sequência promotora – montante controle de Z. mays c.v. B73 (SEQ ID NO: 3).

[0016] A Figura 6 mostra o alinhamento de sequência de polinucleotídeos das regiões 5'-UTR/líder de Z. mays c.v. B104 (SEQ ID NO: 6) comparado à sequência 5'-UTR/líder controle de Z. mays c.v. B73 (SEQ ID NO: 5).

[0017] A Figura 7 mostra o alinhamento de sequências de polinucleotídeos das regiões ítron de Z. mays c.v. B104 (SEQ ID NO: 8)

comparado à sequência ítron controle de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 7).

[0018] A Figura 8 mostra um mapa vetor de construto de expressão binária, pDAB105748, compreendendo o vetor de entrada controle, pDAB105742 (*Z. mays* c.v. B73), inserido em vetor de destinação, pDAB10197.

[0019] A Figura 9 mostra um mapa vetor de uma construto de expressão binária, pDAB105745, compreendendo o vetor de entrada, pDAB105739 (*Z. mays* c.v. B104), inserido no vetor de destinação, pDAB10197.

[0020] A Figura 10 mostra expressão de gene PhiYFP em calli de planta T₀ para construtos de expressão binária pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) e pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104).

[0021] A Figura 11 mostra expressão de gene PhiYFP em pólen de planta T₁ para construtos de expressão binária pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73), pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), e um controle negativo.

Descrição Detalhada

Definições

[0022] Como aqui usados, os artigos “um”, “uma”, e “o” incluem referências plurais a menos que o contexto claramente e não ambigamente dite de outra maneira.

[0023] Como aqui usado, o termo “retrocruzamento” refere-se a um processo no qual um reproduutor cruza progênie híbrida de volta para um dos parentes, por exemplo, uma primeira geração híbrida F1 com um dos genótipos parentes do híbrido F1.

[0024] Como aqui usado, o termo “ítron” refere-se a qualquer sequência de ácido nucleico compreendida em um gene (ou sequência de nucleotídeos expressa de interesse) que é transcrita, mas não traduzida. Ítrons incluem sequência de ácidos nucleicos não traduzida

dentro de uma sequência expressa de DNA, assim como uma sequência correspondendo em moléculas de RNA transcritas da mesma.

[0025] Um construto aqui descrito também pode conter sequências que aperfeiçoam tradução e/ou estabilidade de mRNA tais como íntrons. Um exemplo de um tal ítron é o primeiro ítron de gene II da variante H3 histona de *Arabidopsis thaliana* ou qualquer outra sequência ítron comumente conhecida. Íntrons podem ser usados em combinação com uma sequência promotora para aperfeiçoar tradução e/ou estabilidade de mRNA.

[0026] Como aqui usado, os termos “região não traduzida-5” ou “5'-UTR” refere-se a um segmento não traduzido no terminus 5' de pré-mRNAs ou mRNAs maduros. Por exemplo, sobre mRNAs maduros, uma 5'-UTR tipicamente abriga sobre sua extremidade 5' uma capa 7-metil guanosina e está envolvida em muitos processos tais como remoção de íntrons, poliadenilação, exportação de mRNA na direção de citoplasma, identificação da extremidade 5' do mRNA pela maquinaria de tradução, e proteção dos mRNAs contra degradação.

[0027] Como aqui usado, o termo “região 3' não traduzida” ou “3'-UTR” refere-se a um segmento não traduzido em um terminus 3' dos pré-mRNAs ou mRNAs maduros. Por exemplo, sobre mRNAs maduros esta região abriga a cauda poli-(A) e é conhecida ter muitos papéis em estabilidade de mRNA, início de tradução, e exportação de mRNA.

[0028] Como aqui usado, o termo “sinal de poliadenilação” refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos presente em transcritos mRNA que permite transcritos, quando na presença de uma poli-(A) polimerase, serem poliadenilados sobre o sítio de poliadenilação, por exemplo, localizado 10 a 30 bases a jusante do sinal poli-(A). Muitos sinais de poliadenilação são conhecidos na técnica e são úteis para a presente invenção. Uma sequência exemplar inclui AAUAAA e suas

variantes, como descrito em Loke J., et al., (2005) Plant Physiology 138(3); 1457-1468.

[0029] Como aqui usado, o termo “isolado” refere-se a um componente biológico (incluindo um ácido nucleico ou proteína) que foi separado de outros componentes biológicos na célula do organismo no qual o componente ocorre naturalmente (isto é, outro DNA cromossômico e extracromossômico).

[0030] Como aqui usado, o termo “purificado” em referência a moléculas de ácido nucleico não requer pureza absoluta (tal como uma preparação homogênea). Ao invés, “purificada” representa uma indicação de que a sequência é relativamente mais pura do que em seu ambiente celular nativo. Por exemplo, o nível “purificado” de ácidos nucleicos deve ser pelo menos 2-5 vezes maior em termos de concentração ou níveis de expressão de gene como comparado a seu nível natural.

[0031] As moléculas de DNA reivindicadas podem ser diretamente obtidas do DNA total ou RNA total. Em adição, clones cDNA não estão ocorrendo naturalmente, mas antes são preferivelmente obtidos via manipulação de substância ocorrendo naturalmente , parcialmente purificada (RNA mensageiro). O construto de uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA envolve a criação de uma substância sintética (cDNA). Clones de cDNA individuais podem ser purificados a partir da biblioteca sintética através de seleção clonal das células transportando a biblioteca de cDNA. Assim, o processo que inclui O construto de uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA e purificação de clones de cDNA distintos rende uma purificação de aproximadamente 10^6 vezes da mensagem nativa. Da mesma maneira, uma sequência DNA promotora pode ser clonada em um plasmídeo. Um tal clone não está ocorrendo naturalmente, mas antes é preferivelmente obtido via manipulação de uma substância ocorrendo naturalmente, parcialmente purificada, tal como uma biblioteca de DNA genômico. Assim, purificação de pelo

menos uma ordem de magnitude, preferivelmente duas ou três ordens, e mais preferivelmente quatro ou cinco ordens de magnitude, é favorecida nestas técnicas.

[0032] Similarmente, purificação representa uma indicação de que uma mudança química ou funcional na sequência de DNA componente ocorreu. Moléculas de ácido nucleico e proteínas que foram “purificadas” incluem moléculas de ácido nucleico e proteínas purificadas através de processos padrões de purificação. O termo “purificada” também abrange ácidos nucleicos e proteínas preparadas através de processos de DNA recombinante em uma célula hospedeira (por exemplo, células de plantas), assim como moléculas de ácidos nucleicos sintetizadas quimicamente, proteínas, e peptídeos.

[0033] O termo “recombinante” significa uma célula ou organismo no qual recombinação genética ocorreu. Ele também inclui uma molécula (por exemplo, um vetor, plasmídeo, ácido nucleico, polipeptídeo, ou um RNA pequeno) que foi artificialmente ou sinteticamente (isto é, não naturalmente) alterada através de intervenção humana. A alteração pode ser realizada sobre a molécula dentro, ou removida, de seu ambiente ou estado natural.

[0034] Como aqui usado, o termo “expressão” refere-se ao processo através do qual um polinucleotídeo é transcrito em mRNA (incluindo moléculas de RNA pequeno) e/ou o processo através do qual o mRNA transcrito (também referido como “transcrito”) é subsequentemente traduzido em peptídeos, polipeptídeos, ou proteínas. Expressão de gene pode ser influenciada por sinais externos, por exemplo, exposição de uma célula, tecido, ou organismo a um agente que aumenta ou diminui expressão de gene. Expressão de um gene também pode ser regulada em qualquer lugar no caminho a partir de DNA para RNA para proteína. Regulação de expressão de gene ocorre, por exemplo, através de controles atuando sobre transcrição, tradução, transporte e

processamento de RNA, degradação de moléculas intermediárias, como mRNA, ou através de ativação, inativação, compartimentalização, ou degradação de específicas moléculas de proteína após elas terem sido fabricadas, ou através de combinação das mesmas. Expressão de gene pode ser medida no nível de RNA ou o nível de proteína através de qualquer processo conhecido na técnica, incluindo, sem limitação, Northern blot, RT-PCR, Western blot, ou ensaio(s) de atividade de proteínas in situ ou in vivo.

[0035] Como aqui usados, os termos “silenciamento de gene baseado em homologia” ou “HBGS” são termos genéricos que incluem ambos, silenciamento transcricional de gene e silenciamento pós-transcricional de gene. Silenciamento de um locus alvo através de um locus de silenciamento não ligado pode resultar de inibição de transcrição (por exemplo, silenciamento de gene transcricional; TGS) ou degradação de mRNA (por exemplo, silenciamento de gene pós-transcricional; PTGS), devido à produção de RNA de fita dupla (dsRNA) correspondendo a sequências promotoras ou transcritas, respectivamente. Envolvimento de distintos componentes celulares em cada processo sugere que TGS e PTGS induzidos por ds-RNA provavelmente resultam da diversificação de um mecanismo comum antigo. Entretanto, uma estrita comparação de TGS e PTGS tem sido difícil de se obter, porque ela baseia-se genericamente em análises de distintos loci de silenciamento. Um único locus transgene pode ser descrito disparar ambos, TGS e PTGS, devido à produção de dsRNA correspondendo a sequências promotoras e transcritas de diferentes genes alvos.

[0036] Como aqui usados, os termos “molécula de ácido nucleico”, “ácido nucleico”, ou “polinucleotídeo” (todos os três termos sendo sinônimos uns com os outros) referem-se a uma forma polimérica de nucleotídeos, que pode incluir ambas, fitas sentido e antissenso de

RNA, cDNA, DNA genômico, e formas sintéticas, e seus polímeros mistos. Um “nucleotídeo” pode referir-se a um ribonucleotídeo, desoxirribonucleotídeo, ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. Uma molécula de ácido nucleico é usualmente de pelo menos dez bases em comprimento, a menos que especificado de outro modo. Os termos podem referirem-se a uma molécula de RNA ou DNA de comprimento indeterminado. Os termos incluem formas de DNA de fita simples e dupla. Uma molécula de ácido nucleico pode incluir formas de DNA de fita simples e dupla. Uma molécula de ácido nucleico pode incluir qualquer um ou ambos, nucleotídeos ocorrendo naturalmente e modificados ligados por ligações de nucleotídeos ocorrendo naturalmente e/ou ocorrendo não naturalmente.

[0037] Moléculas de ácido nucleico podem ser modificadas quimicamente ou bioquimicamente, ou podem conter bases nucleotídeos não naturais ou derivadas, como será facilmente apreciado por aqueles versados na técnica. Tais modificações incluem, por exemplo, rótulos, metilação, substituição de um ou mais dos nucleotídeos ocorrendo naturalmente com um análogo, modificações inter-nucleotídeos (por exemplo, ligações não carregadas, tais como, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; ligações carregadas, tais como, fósforotioatos, fósforoditioatos, etc; metades pendentes, tais como, peptídeos; intercaladores, tais como, acridina, psoraleno, etc; quelantes; alquilantes; e ligações modificadas, tais como, ácidos alfa anoméricos nucleicos, etc.). O termo “molécula de ácido nucleico” também inclui qualquer conformação topológica, incluindo conformações de fita simples, fita dupla, parcialmente feita duplex, tríplex, de forma de grampo de cabelo, circular, e cadeado.

[0038] Transcrição procede em uma maneira 5' para 3' ao longo de fita de DNA. Isto significa que RNA é obtido através de adição sequencial de ribonucleotídeo-5'-trifosfatos ao terminus 3' da cadeia

crescendo com uma requisitada eliminação do pirofosfato. Em uma molécula de ácido nucleico tanto linear como circular, elementos discretos (por exemplo, particulares sequências de nucleotídeos) podem ser referidos como estando “a montante” em relação a ainda um elemento se eles estão ligados ou podem ser ligados ao mesmo ácido nucleico na direção 5’ a partir daquele elemento. Similarmente, elementos discretos podem ser referidos como estando “à jusante” em relação a ainda um elemento se eles são ou podem ser ligados ao mesmo ácido nucleico na direção 3’ a partir daquele elemento.

[0039] Como aqui usado, o termo “posição de base” refere-se à localização de um dado resíduo de base ou nucleotídeo dentro de um designado ácido nucleico. Um designado ácido nucleico pode ser definido através de alinhamento com um ácido nucleico de referência.

[0040] Como aqui usado, o termo “hibridização” refere-se a um processo onde oligonucleotídeos e seus análogos hibridizam através de ligação com hidrogênio, que inclui ligação de hidrogênio Watson – Crick, Hoogsteen, ou Hoogsteen reversa, entre bases complementares. Genericamente, moléculas de ácidos nucleicos consistem em bases nitrogenadas que são tanto pirimidinas, como citosina (C), uracila (U), e timina (T), ou purinas, tais como adenina (A) e guanina (G). Bases nitrogenadas formam ligações hidrogênio entre uma pirimidina e uma purina, e ligação de uma pirimidina a uma purina é referida como “emparelhamento de base”. Mais especificamente, A formará uma específica ligação hidrogênio para T ou U, e G ligará especificamente a C. “Complementar” refere-se ao emparelhamento de base que ocorre entre duas sequências distintas de ácidos nucleicos ou duas regiões distintas da mesma sequência de ácido nucleico.

[0041] Como aqui usados, os termos “especificamente hibridizável” e “especificamente complementar” referem-se a um grau suficiente de complementaridade de modo que estável e específica ligação

ocorra entre um oligonucleotídeo e um DNA ou RNA alvo. Oligonucleotídeos não precisam ser 100% complementares para a sequência alvo para hibridizarem especificamente. Um oligonucleotídeo é especificamente hibridizável quando ligação do oligonucleotídeo à molécula de DNA ou RNA alvo interfere com a função normal do DNA ou RNA alvo, e há um grau suficiente de complementaridade para evitar ligação não específica de um oligonucleotídeo a sequências não alvos sob condições onde ligação específica é desejada, por exemplo, sob condições fisiológicas no caso de ensaios ou sistemas *in vivo*. Tal ligação é referida como uma hibridização específica. Condições de hibridização resultando em particulares graus de rigorosidade irão variar dependendo da natureza do processo de hibridização escolhido e a composição e comprimento das sequências de ácidos nucleicos hibridizantes. Genericamente, a temperatura de hibridização e a resistência iônica (especialmente concentração de Na^+ e/ou Mg^{2+}) de um tampão de hibridização contribuirão para a rigorosidade de hibridização, embora tempos de lavagem também influenciem rigorosidade. Cálculos com relação a condições de hibridização requeridas para obtenção de particulares graus de rigorosidade são discutidos em Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Col Spring Harbor, New York, 1989.

[0042] Como aqui usado, o termo “condições rigorosas” abrange condições sob as quais hibridização somente ocorrerá se há menos que 50% de desemparelhamento entre a molécula de hibridização e o alvo DNA. “Condições rigorosas” ainda incluem níveis particulares de rigorosidade. Assim, como aqui usado, condições de “rigorosidade moderada” são aquelas sob as quais moléculas com mais que 50% de desemparelhamento de sequência não hibridizarão; condições de “alta rigorosidade” são aquelas sob as quais sequências com mais que 20% de desemparelhamento não hibridizarão; e condições de “rigorosidade

muito alta” são aquelas sob as quais sequências com mais que 10% de desemparelhamento não hibridizarão. Em particulares modalidades, condições rigorosas podem incluir hibridização a 65°C, seguida por lavagens a 65°C com 0,1 x SSC/0,1% SDS por 40 minutos. As seguintes são representativas condições de hibridização, não limitantes:

- Rigorosidade muito alta: hibridização em tampão 5x SSC a 65°C por 16 horas; lavagem duas vezes em tampão 2x SSC em temperatura ambiente por 15 minutos cada; e lavagem duas vezes em tampão 0,5x SSC a 65°C por 20 minutos cada.
- Alta rigorosidade: hibridização em tampão 5-6x SSC a 65-70°C por 16-20 horas; lavar duas vezes em tampão 2x SSC em temperatura ambiente por 5-20 minutos cada; e lavagem duas vezes em tampão 1xSSC a 55-70°C por 30 minutos cada.
- Rigorosidade Moderada: hibridização em tampão 6x SSC em temperatura ambiente até 55°C por 20-30 minutos cada.

[0043] Em uma modalidade, moléculas de ácidos nucleicos especificamente hibridizáveis podem permanecer ligadas sob condições de hibridização muito rigorosas. Em uma modalidade, moléculas de ácido nucleico especificamente hibridizáveis podem permanecer ligadas sob condições de hibridização de alta rigorosidade. Em uma modalidade, moléculas de ácidos nucleicos especificamente hibridizáveis podem permanecer ligadas sob condições de hibridização de rigorosidade moderada.

[0044] Como aqui usado, o termo “oligonucleotídeo” refere-se a um polímero de ácido nucleico curto. Oligonucleotídeos podem ser formados por clivagem de segmentos de ácidos nucleicos mais longos ou através de polimerização de precursores de nucleotídeos individuais. Sintetizadores automatizados permitem a síntese de oligonucleotídeos de até várias centenas de pares de bases em comprimento. Devido aos oligonucleotídeos poderem se ligar a uma sequência de nu-

cleotídeos complementar, eles podem ser usados como sondas para detecção de DNA ou RNA. Oligonucleotídeos compostos por DNA (oligodesoxirribonucleotídeos) podem ser usados em reação de Cadeia Polimerase, uma técnica para a amplificação de pequenas sequências de DNA. Em Reação de Cadeia Polimerase, um oligonucleotídeo é tipicamente referido como um “iniciador” que permite uma DNA polimerase estender o oligonucleotídeo e replicar a fita complementar.

[0045] Como aqui usados, os termos, “Reação de Cadeia Polimerase” ou “PCR” referem-se a um procedimento ou técnica na qual quantidades diminutas de ácido nucleico, RNA, e/ou DNA, são amplificadas como descrito na patente U.S. 4 683 195. Genericamente, informação de sequência a partir das extremidades da região de interesse ou além precisa ser disponível, de modo que iniciadores oligonucleotídeos possam ser projetados. Iniciadores de PCR serão idênticos ou similares em sequência a fitas opostas do molde de ácido nucleico a ser amplificado. Os nucleotídeos terminais 5' dos dois iniciadores podem coincidir com as extremidades do material amplificado. PCR pode ser usada para amplificar específicas sequências de RNA ou sequências de DNA a partir de DNA genômico total e cDNA transscrito do RNA celular total, bacteriófago, ou sequências plasmídeos, etc. Ver, genericamente, Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263(1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989).

[0046] Como aqui usado, o termo “iniciador” refere-se a um oligonucleotídeo capaz de atuar como um ponto de partida de síntese ao longo de uma fita completar quando condições são apropriadas para síntese de um produto de extensão de iniciador. As condições de síntese incluem a presença de quatro diferentes desoxirribonucleotídeos trifosfatos (isto é, A, T, G e C) e pelo menos um agente de indução de polimerização ou enzima tal como Transcriptase Reversa ou DNA po-

limerase. Estes reagentes estão tipicamente presentes em um apropriado tampão que pode incluir constituintes que são cofatores ou que afetam condições, tais como pH e semelhantes em várias temperaturas apropriadas. Um iniciador é preferivelmente uma sequência de fita simples, de modo que a eficiência de amplificação é otimizada, mas sequências de fita dupla podem ser utilizadas.

[0047] Como aqui usado, o termo “sonda” refere-se a uma sequência de oligonucleotídeos ou polinucleotídeos que hibridiza para uma sequência alvo. No procedimento de ensaio TaqMan ou TaqMan-style, a sonda hibridiza para uma porção do alvo situada entre o sítio de anelamento dos dois iniciadores. Uma sonda inclui cerca de oito nucleotídeos, cerca de dez nucleotídeos, cerca de quinze nucleotídeos, cerca de vinte nucleotídeos, cerca de trinta nucleotídeos, cerca de quarenta nucleotídeos, ou cerca de cinquenta nucleotídeos. Em algumas modalidades, uma sonda inclui de cerca de oito nucleotídeos a cerca de quinze nucleotídeos.

[0048] No procedimento de ensaio de Southern blot, a sonda hibridiza para um fragmento de DNA que está ligado a uma membrana. Uma sonda inclui cerca de dez nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, cerca de 250 nucleotídeos, cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 1000 nucleotídeos, cerca de 2500 nucleotídeos, ou cerca de 5000 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a sonda inclui de cerca de 500 nucleotídeos a cerca de 2500 nucleotídeos.

[0049] Uma sonda ainda pode incluir um rótulo detectável, tal como um rótulo radioativo, um rótulo biotinilado, um fluoróforo (por exemplo, Vermelho – Texas, isotiocianato de fluoresceína, etc.). O rótulo detectável pode estar ligado covalentemente diretamente ao oligonucleotídeo sonda, de modo que o rótulo esteja localizado na extremidade 5' ou extremidade 3' da sonda. Uma sonda compreendendo um fluoróforo também ainda pode incluir um corante resfriador (por exem-

plo, Black Hole Quencher, Iowa Black, etc.).

[0050] Como aqui usados, os termos “identidade de sequência” ou “identidade” podem ser usados intercambiavelmente e referem-se aos resíduos de ácidos nucleicos em duas sequências que são as mesmas quando alinhadas para máxima correspondência sobre uma especificada janela de comparação.

[0051] Como aqui usado, o termo “porcentagem de identidade de sequência” ou “porcentagem de homologia de sequência” refere-se a um valor determinado por comparação de duas sequências otimamente alinhadas (por exemplo, sequências de ácidos nucleicos ou sequências de aminoácidos) sobre uma janela de comparação, onde a porção de uma sequência na janela de comparação pode compreender adições, substituições, desemparelhamentos, e/ou supressões (isto é, folgas) como comparado a uma sequência referência de modo a obter ótimo alinhamento das duas sequências. Uma porcentagem é calculada através de determinação de número de posições nas quais um resíduo de ácido nucleico ou aminoácido idêntico ocorre em ambas as sequências para render o número de posições emparelhadas, divisão do número de posições emparelhadas pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicação do resultado por 100 para render a porcentagem de identidade de sequência. Processos para alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos. Vários programas de bioinformática ou de computador e algoritmos de alinhamento, como ClustalE e Sequencher, também são bem conhecidos na técnica e/ou descritos em, por exemplo: Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pear-

son et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50.

[0052] O National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10) é disponível de várias fontes, incluindo National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD), e na internet, para uso em conexão com vários programas de análise de sequências. Uma descrição de como determinar identidade de sequência usando este programa é disponível na internet sob a seção "help" para BLAST. Para comparação de sequências de ácidos nucleicos, a função "Blast 2 sequences" do programa BLAST (Blastn) pode ser empregada usando os parâmetros default. Sequências de ácidos nucleicos mesmo com maior similaridade às sequências de referência mostrarão crescente porcentagem de identidade quando avaliadas através deste processo.

[0053] Como aqui usado, o termo "operavelmente ligado" refere-se a um ácido nucleico colocado em uma relação funcional com um outro ácido nucleico. Genericamente, "operavelmente ligado" pode significar que ácidos nucleicos são contíguos. Ligação pode ser realizada através de ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, adaptadores ou ligadores oligonucleotídeos sintéticos são ligados ou anelados ao ácido nucleico e usados para ligação de fragmento de polinucleotídeos contíguo. Entretanto, elementos não precisam ser contíguos para serem ligados operavelmente.

[0054] Como aqui usado, o termo "promotor" refere-se a uma região de DNA que é genericamente localizada à montante de um gene (isto é, na direção de extremidade 5' de um gene) e é necessária para iniciar e dirigir transcrição do gene. Um promotor pode permitir própria ativação ou repressão de um gene que ele controla. Um promotor pode conter específicas sequências que são reconhecidas por fatores de

transcrição. Estes fatores podem se ligar a uma sequência de DNA promotora, o que resulta no recrutamento de RNA polimerase, uma enzima que sintetiza RNA a partir de região codificante do gene. O promotor genericamente refere-se a todos os elementos reguladores de gene localizados à montante do gene, incluindo 5'-UTR, íntrons, e sequências líderes.

[0055] Como aqui usado, o termo “promotor à montante” refere-se a uma sequência de polinucleotídeos contíguos que é suficiente para direcionar iniciação de transcrição. Como aqui usado, um promotor à montante abrange o sítio de iniciação de transcrição com vários motivos de sequências, que incluem uma Caixa TATA, sequência iniciadora (Intr.), elementos de reconhecimento TFIIB (BRE), e outros motivos promotores (Jennifer, E. F. et al. (2002) Genes & Dev., 16:2583-2592). O promotor à montante provê o sítio de ação para RNA polimerase II, uma enzima multi-subunidades com os fatores de transcrição genérica ou basal como, TFIIA, B, D, E, F, e H. Estes fatores montam em um complexo pré-iniciação de transcrição (OIC) que catalisa a síntese de RNA a partir de um molde de DNA.

[0056] A ativação do promotor à montante é realizada através de adição de elementos de sequência de DNA reguladores aos quais várias proteínas se ligam e subsequentemente interagem com o complexo de iniciação de transcrição para ativação de expressão de gene. Estas sequências de elementos reguladores de gene interagem com específicos fatores de ligação de DNA. Estes motivos de sequência algumas vezes podem ser referidos como elementos-cis. Tais elementos cis, aos quais fatores de transcrição específicos de tecido ou específicos de desenvolvimento se ligam, individualmente ou em combinação, podem determinar o padrão de expressão espaço – temporal de um promotor no nível transcricional. Estes elementos cis variam amplamente no tipo de controle que eles podem exercer sobre genes li-

gados operavelmente. Alguns elementos atuam para aumentar a transcrição de genes ligados operavelmente em resposta a respostas ambientais (por exemplo, temperatura, umidade e ferimento). Outros elementos – cis podem responder para sugestões desenvolvimentais (por exemplo, germinação, maturação de semente, e florescência) ou para informação espacial (por exemplo, especificidade de tecido). Ver, por exemplo, Langridge et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219-23. Estes elementos-cis estão localizados em uma distância variável a partir do ponto de início de transcrição. Alguns elementos-cis (chamados elementos proximais) são adjacentes a uma região promotora de núcleo mínima, enquanto outros elementos podem estar posicionados várias quilobases 5' à montante ou 3' à jusante do promotor (aperfeiçoadores).

[0057] Como aqui usado, o termo “transformação” abrange todas as técnicas nas quais uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida em uma célula. Exemplos incluem, mas não são limitados a: transfecção com vetores virais; transformação com vetores plasmídeos; eletroporação; lipofecção; microinjeção (Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85); transferência mediada por Agrobacterium; absorção direta de DNA; transformação mediada por WHISKERS™; e bombardeio com micropólipos. Estas técnicas podem ser usadas para ambas, transformação estável e transformação transitória de uma célula de planta. “Transformação estável” refere-se à introdução de um fragmento de ácido nucleico em um genoma de um organismo hospedeiro resultando em herança geneticamente estável. Uma vez estavelmente transformado, o fragmento de ácido nucleico é estavelmente integrado no genoma do organismo hospedeiro e qualquer subsequente geração. Organismos hospedeiros contendo o fragmento de ácido nucleico transformado são referidos como organismos “transgênicos”. “Transformação transitória” refere-se à introdução de um fragmento de ácido

nucleico no núcleo ou organela contendo DNA de um organismo hospedeiro, resultando em expressão de gene sem herança geneticamente estável.

[0058] Como aqui usado, o termo “transdução” refere-se a um processo onde um vírus transfere ácido nucleico em uma célula.

[0059] Como aqui usado, o termo “transgene” refere-se a uma sequência de ácido nucleico exógena. Em um exemplo, um transgene é uma sequência de gene (por exemplo, um gene de resistência a herbicida), um gene codificando um composto industrial ou farmaceuticamente útil, ou um gene codificando uma desejável característica de agricultura. Ainda em um outro exemplo, um transgene é uma sequência de ácidos nucleicos antissenso, onde expressão da sequência de ácidos nucleicos antissenso inibe expressão de uma sequência de ácidos nucleicos alvo. Um transgene pode conter sequências reguladoras ligadas operavelmente ao transgene (por exemplo, um promotor, ítron, 5'-UTR, ou 3'-UTR)). Em algumas modalidades, um ácido nucleico de interesse é um transgene. Entretanto, em outras modalidades, um ácido nucleico de interesse é um ácido nucleico endógeno, onde adicionais cópias genômicas do ácido nucleico endógeno são desejadas, ou um ácido nucleico que está na orientação antissenso com relação à sequência de um ácido nucleico alvo em um organismo hospedeiro.

[0060] Como aqui usado, o termo “vetor” refere-se a uma molécula de ácido nucleico quando introduzida em uma célula, pelo que produzindo uma célula transformada. Um vetor pode incluir sequências de ácido nucleico que permitem ao mesmo replicar na célula hospedeira, tal como uma origem de replicação. Exemplos incluem, mas não são limitados a, um plasmídeo, cosmídeo, bacteriófago, cromossoma artificial bacteriano (BAC), ou vírus que transporta DNA exógeno em uma célula. Um vetor também pode incluir um ou mais genes, moléculas

antisenso, genes marcadores selecionáveis, e outros elementos genéticos conhecidos na técnica. Um vetor pode transduzir, transformar, ou infectar uma célula, pelo que fazendo com que a célula expresse as moléculas de ácido nucleico e/ou proteínas codificadas pelo vetor. Um vetor opcionalmente pode incluir materiais para auxiliar na obtenção de entrada da molécula de ácido nucleico na célula (por exemplo, uma lipossoma).

[0061] Como aqui usados, os termos “cassete”, “cassete de expressão”, e “cassete de expressão de gene” referem-se a um segmento de DNA que pode ser inserido em um ácido nucleico ou polinucleotídeo em específicos sítios de restrição ou através de recombinação homóloga. Um segmento de DNA compreende um polinucleotídeo contendo um gene de interesse que codifica um RNA pequeno ou um polipeptídeo de interesse, e o cassete e sítios de restrição são projetados para assegurar inserção do cassete no próprio quadro de leitura para transcrição e tradução. Em uma modalidade, um cassete de expressão pode incluir um polinucleotídeo que codifica um RNA pequeno ou um polipeptídeo de interesse e pode ter elementos em adição ao polinucleotídeo que facilitam transformação de uma particular célula hospedeira. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene também pode incluir elementos que permitem expressão aperfeiçoada de um RNA pequeno ou um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de interesse em uma célula hospedeira. Eles elementos podem incluir, mas não são limitados a: um promotor, um promotor mínimo, um aperfeiçoador, um elemento resposta, um ítron, uma 5'-UTR, uma 3'-UTR, uma sequência terminadora, uma sequência de poliadenilação, e semelhantes.

[0062] Como aqui usado, o termo “sequência codificante heteróloga” é usado para indicar qualquer polinucleotídeo que codifique, ou codifique por último, um peptídeo ou proteína ou sua sequência de a-

minoácidos equivalente, por exemplo, uma enzima, que normalmente não está presente no organismo hospedeiro e pode ser expressa na célula hospedeira sob condições próprias. Como tal, “sequências codificantes heterólogas” podem incluir uma ou adicionais cópias de sequências codificantes que normalmente não estão presentes na célula hospedeira, de modo que a célula esteja expressando adicionais cópias de uma sequência codificante que normalmente não está presente nas células. As sequências codificantes heterólogas podem ser RNA ou qualquer um de seus tipos (por exemplo, mRNA), DNA ou qualquer um de seus tipos (por exemplo, cDNA), ou um híbrido RNA/DNA. Exemplos de sequências codificantes incluem, mas não são limitados a, unidades de transcrição de inteiro comprimento que compreendem características tais como a sequência codificante, íntrons, regiões promotoras, 5'-UT, 3'-UTR, e regiões aperfeiçoadoras.

[0063] “Sequências codificantes heterólogas” também incluem a porção codificante do peptídeo ou enzima (isto é, a sequência de cDNA ou mRNA), a porção codificante da unidade transcracional de inteiro comprimento (isto é, o gene compreendendo íntrons e exons), sequências “otimizadas em códon”, sequências truncadas ou outras formas de sequências alteradas que codificam a enzima ou codificam sua sequência de aminoácidos equivalente, contanto que a sequência de aminoácidos equivalente produza uma proteína funcional. Tais sequências de aminoácidos equivalentes podem ter uma supressão de um ou mais aminoácidos, com a supressão sendo terminal-N, terminal-C, ou interna. Formas truncadas são imaginadas tanto quanto elas tenham a capacidade catalítica aqui indicada.

[0064] Como aqui usado, o termo “controle” refere-se a uma amostra usada em um procedimento analítico para propósitos de comparação. Um controle pode ser “positivo” ou “negativo”. Por exemplo, onde o propósito de um procedimento analítico é detectar um transcrito ou

polipeptídeo diferencialmente expresso em células ou tecido, é genericamente preferível incluir um controle positivo, tal como uma amostra de uma planta conhecida exibindo a desejada expressão, e um controle negativo, tal como uma amostra de uma planta conhecida carecendo de desejada expressão.

[0065] Como aqui usado, o termo “planta” inclui plantas e partes de plantas incluindo, mas não limitado a, células de plantas e tecidos de plantas, tais como folhas, calli, hastes, raízes, flores, pólen, e sementes. Uma classe de plantas que pode ser usada na presente invenção é genericamente tão ampla como a classe de plantas superiores e inferiores suscetíveis a mutagênese incluindo angiospermas, gimnospermas, samambaias, e algas multicelulares. Assim, “planta” inclui plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Exemplos de plantas dicotiledôneas incluem tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaia, canola, girassol, algodão, alfafa, batata, videira, ervilha pombo, ervilha, *Brassica*, grão-de-bico, beterraba sacarina, colza, melancia, melão, pimenta, abóbora, rabanete, espinafre, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, repolho Chinês, pepino, berinjela, e alface. Exemplos de plantas monocotiledôneas incluem milho, arroz, trigo, cana-de-açúcar, cevada, centeio, sorgo, orquídeas, bambu, banana, tabuas, lírios, aveia, cebola, painço, e híbrido de trigo e centeio.

[0066] Como aqui usado, o termo “material de planta” refere-se a folhas, calli, troncos, raízes, flores ou partes de flores, frutos, pólen, células ovos, zigotos, sementes, mudas, célula ou culturas de tecido, ou qualquer outra parte ou produto de uma planta. Em uma modalidade, material de planta inclui cotilédone e folha. Em uma modalidade, material de planta inclui tecidos de raiz e outros tecidos de planta localizados no subsolo.

[0067] Como aqui usado, o termo “gene marcador selecionável” refere-se a um gene que é opcionalmente usado em transformação de

planta para, por exemplo, proteger células de plantas de um agente seletivo ou prover resistência / tolerância para um agente seletivo. Em adição, “gene marcador selecionável” é pretendido para abranger genes repórteres. Somente aquelas células ou plantas que recebem um marcador selecionável funcional são capazes de dividir ou crescer sob condições tendo um agente seletivo. Exemplos de agentes seletivos podem incluir, por exemplo, antibióticos, incluindo spectinomicina, neomicina, canamicina, paromomicina, gentamicina, e higromicina. Estes marcadores selecionáveis incluem neomicina fosfotransferase (npt II), que expressa uma enzima conferindo resistência para o antibiótico canamicina, e genes para os antibióticos relacionados neomicina, paromomicina, gentamicina, e G418, ou o gene para higromicina fosfotransferase (hpt), que expressa uma enzima conferindo resistência para higromicina. Outros genes marcadores selecionáveis podem incluir genes codificando resistência a herbicida incluindo bar ou pat (resistência contra glufosinato de amônio ou fosfotricina), acetolactato sintase (ALS, resistência contra inibidores tais como sulfonil ureias (SUs), imidazolinonas (IMIs), triazolopirimidinas (TPs), oxibenzoatos de pirimidinila (POBs), e sulfonil amino carbonil triazolinonas que evitam a primeira etapa na síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada), glicofosato, 2,4-D, e resistência ou sensitividade a metal. Exemplos de “genes repórteres” que podem ser usados como um gene marcador selecionável incluem a observação visual de proteínas de gene repórter, tais como proteínas codificando beta-glicuronidase (GUS), luciferase, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarela (YFP), DsRed, beta-galactosidase, cloranfenicol acetil transferase (CAT), fosfatase alcalina, e semelhantes. A frase “marcador positivo” refere-se a plantas que foram transformadas para incluir um gene marcador selecionável.

[0068] Como aqui usado, o termo “marcador detectável” refere-se

a um rótulo capaz de detecção, tal como, por exemplo, um radioisótopo, composto fluorescente, composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, quelante de metal, ou enzima. Exemplos de marcadores detectáveis incluem, mas não são limitados aos seguintes: rótulos fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos lantânicos), rótulos enzimáticos (por exemplo, peroxidase de raiz forte, beta-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), quimioluminescente, grupos biotinila, predeterminados epítopos polipeptídeos reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências pares de zíper leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas epítopos). Em uma modalidade, um marcador detectável pode ser ligado através de braços espaçadores de vários comprimentos para redução de potencial impedimento estérico.

[0069] Como aqui usado, o termo “detecção” é usado no sentido mais amplo para incluir ambas as medições qualitativas e quantitativas de uma específica molécula, por exemplo, medições de um específico polipeptídeo.

[0070] A menos que de outro modo especificamente explicado, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendido por aqueles versados na técnica à qual esta exposição pertence. Definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em, por exemplo: Levin, Genes V, Oxford University Press, 1994; Kendrew *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994; e Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995.

Promotores Como elementos Reguladores de Expressão de Gene

[0071] Promotores de plantas usados para pesquisa básica ou aplicações biotecnológicas são genericamente unidireccionais, direcionando a expressão constitutiva de um transgene que foi fundido a sua

extremidade 3' (jusante). É frequentemente necessário expressar robustamente transgenes dentro de plantas para engenharia metabólica e empilhamento de características. Em adição, múltiplos novos promotores são tipicamente requeridos em colheitas transgênicas para acionamento de expressão de múltiplos genes. É aqui mostrado um promotor constitutivo que pode direcionar a expressão de um transgene que foi fundido em sua extremidade 3'.

[0072] Desenvolvimento de produtos transgênicos está se tornando crescentemente complexo, o que requer expressão robusta de transgenes e empilhamento de múltiplos transgenes em um único locus. Tradicionalmente, cada transgene requer um único promotor para expressão onde múltiplos promotores são requeridos para expressão de diferentes transgenes dentro de uma pilha de genes. Com um crescente tamanho de pilhas de genes, este processo frequentemente conduz a repetido uso do mesmo promotor para obtenção de níveis similares de padrões de expressão de diferentes transgenes para expressão de uma única característica poligênica.

[0073] Construtos multigenes acionadas pelo mesmo promotor são conhecidas causarem o silenciamento de gene, resultando em produtos transgênicos menos eficazes no campo. Excesso de sítios de ligação de fator de transcrição (TF) devido à repetição de promotor pode causar esgotamento de TFs endógenos conduzindo a inativação transcracional. O silenciamento de transgenes é provável de afetar indesejavelmente desempenho de uma planta transgênica produzida para expressar transgenes. Sequências repetitivas dentro de um transgene podem conduzir a recombinação homóloga de locus intra gene resultando em rearranjos de polinucleotídeos.

[0074] Em adição a promotores constitutivos, promotores específicos de tecido, ou específicos de órgão acionam expressão de gene em certos tecidos como no núcleo, raiz, folha, callus, pólen, ou tapetum da

planta. Promotores específicos de estágio de desenvolvimento e tecido acionam a expressão de genes, que são expressos em particulares tecidos ou em particulares períodos de tempo durante desenvolvimento de planta. Promotores específicos de tecido são requeridos para certas aplicações na indústria de planta transgênica e são desejáveis na medida em que eles permitem específica expressão de genes heterólogos em um tecido e/ou em selecionados estágios de desenvolvimento, indicando expressão do gene heterólogo diferencialmente em vários órgãos, tecidos e/ou em diferentes momentos, mas não outros.

[0075] Por exemplo, aumentada resistência de uma planta para infecção por patógenos transportados por solo pode ser realizada através de transformação de genoma de planta com um gene de resistência a patógeno de modo que uma proteína de resistência a patógeno seja robustamente expressa dentro da planta. Alternativamente, pode ser desejável expressar um transgene em tecidos de planta que estão em uma particular fase de crescimento ou desenvolvimento tal como, por exemplo, divisão ou elongação de célula. Uma outra aplicação é o desejo de uso de promotores específicos de tecido, de modo que os promotores possam confinar a expressão dos transgenes codificando uma característica agronômica em partes de planta em desenvolvimento (isto é, raízes, folhas, calli, ou pólen).

[0076] Os promotores aqui descritos são ferramentas promissoras para fabricação de construtos transgenes comerciais contendo múltiplos genes. Estes promotores também provêm estabilidade estrutural em hospedeiros bacterianos e estabilidade funcional em células de plantas, tal como redução de silenciamento de transgene, para permitir expressão de transgene. Promotores com faixas de expressão variáveis também podem ser obtidos através de emprego de processos aqui descritos. Comparadas a construtos de transgene usando um único promotor múltiplas vezes, os construtos promotores diversificados

descritos neste pedido de patente são mais compatíveis para análises moleculares à jusante de eventos transgênicos. Uso dos promotores diversificados aqui descritos pode também aliviar o rearranjo em loci multigenes transgênicos durante alvejamento com tecnologia de dedo de zinco (SHUKLA et al. 2009).

Promotores Ubiquitina-1 de Zea mays

[0077] O promotor Ubi-1 de *Zea mays* tem sido um padrão na indústria de biotecnologia, predominantemente usado para alta expressão transgênica, estável em milho (CHRISTENSEN e QUAIL 1996; CHRISTENSEN et al. 1992; TOKI et al. 1992). Cada transgene usualmente requer um específico promotor para suficiente expressão. Múltiplos promotores são tipicamente requeridos para expressão de diferentes transgenes dentro de uma pilha de genes. Este paradigma frequentemente conduz ao uso repetitivo do promotor Ubi-1 de *Z. mays* devido a seus desejados altos níveis de expressão de proteína e padrão de expressão constitutiva.

[0078] Entretanto, a deliberada introdução de sequências repetitivas em um locus transgênico também pode conduzir a indesejáveis efeitos negativos sobre expressão e estabilidade de transgene (FLADUNG and KUMAR 2002; KUMAR and FLADUNG 2000^a; KUMAR and FLADUNG 2000b; KUMAR and FLADUNG 2001a; KUMAR and FLADUNG 2001b; KUMAR and FLADUNG 2002; METTE et al. 1999; MOURRAIN et al. 2007). O desafio de múltipla expressão de transgene coordenada pode ser endereçado usando uma abordagem de diversidade de promotor, onde diferentes promotores são usados para acionamento de diferentes transgenes com o mesmo perfil de expressão (PEREMARTI et al. 2010). Este pedido de patente descreve uma diversificada sequência promotora Ubi-1 obtida através de identificação e purificação de novo promotor a partir de diferentes genótipos de *Zea mays*.

[0079] Iniciação de transcrição e modulação de expressão de gene em genes de plantas são direcionadas por uma variedade de elementos de sequência de DNA coletivamente arranjados em uma maior sequência chamada um promotor. Promotores eucarióticos consistem tipicamente em um promotor de núcleo mínimo e sequências reguladoras à montante. O promotor de núcleo é um estiramento mínimo de sequência de DNA contígua que é suficiente para direcionar uma precisa iniciação de transcrição. Promotores de núcleo em plantas genericamente compreendem regiões canônicas associadas com o início de transcrição, como caixas CAAT e TATA (sequência consenso TATA-WAW). O elemento de caixa TATA está usualmente localizado aproximadamente 20 a 35 pares de bases (pb) à montante do sítio de início de transcrição (TSS). A ativação do promotor de núcleo é realizada por sequências reguladoras à montante às quais várias proteínas se ligam e subsequentemente interagem com o complexo de iniciação de transcrição para ativar expressão de gene. Estes elementos reguladores compreendem sequências de DNA que determinam o padrão de expressão espaço-temporal de um promotor.

[0080] Referindo-se a Figura 1, o promotor de gene Ubi-1 de *Zea mays* é derivado da linha de células inata de *Z. mays* B73. O promotor Ubi-1 de *Z. mays* é compreendido por aproximadamente 895 pb de sequência de DNA localizada 5' à montante da TSS (isto é, o elemento à montante). Em adição, o promotor Ubi-1 de *Z. mays* é compreendido por cerca de 1093 pb de sequência de DNA localizada 3' à jusante de TSS (ver patente U.S. N° 5 510 474). Assim, o promotor Ubi-1 de *Z. mays* é compreendido por aproximadamente 2 Kilo pares de bases (kb) de sequência de DNA total.

[0081] O elemento à montante do promotor Ubi-1 de *Z. mays* compreende uma caixa TATA localizada aproximadamente 30 pb 5' à montante da TSS (Figs. 1 e 3). Em adição, o Elemento à Montante

compreende dois elementos consensos de choque térmico em sobreposição localizados imediatamente 5' à montante da TSS. Uma 5'-UTR ou sequência líder de 82 pb está localizada imediatamente 3' à jusante da TSS e é seguida por um ítron que se estende a partir da base 83 para 1093 (Figuras. 1 e 3).

[0082] Trabalho anterior descreveu aumentada expressão de gene de genes e/ou transgenes regulados pelo promotor Ubi-1 de *Z. mays*. Por exemplo, a fusão de transcrição do gene cloranfenicol acetil transferase (CAT) para o promotor Ubi-1 de *Z. mays* rendeu nível de atividade de CAT mais que 10 vezes maior em protoplastos de milho do que expressão dirigida pelo promotor 35S de vírus de mosaico de couve-flor (CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN et al. 1992).

[0083] Em adição ao promotor Ubi-1 de *Z. mays* controle, este pedido de patente descreve um novo promotor Ubi-1 de milho. Diferente de promotor Ubi-1 controle derivado de *Z. mays* genótipo c.v. B73, o novo promotor Ubi-1 foi derivado de *Z. mays* genótipo c.v. B104. São providos construtos e processos usando um promotor Ubi-1 de *Z. mays* compreendendo uma sequência de polinucleotídeos. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como se segue:

```
GTGCAGCGTGACCCGGTGTGCCCTCTAGAGATAATGAGCATTGCAT
GTCTAAGTTATAAAAATTACCACATATTTTTGTCACTTGTTGAA
GTGCAGTTATCTATCTTATACATATTTAACTTACTCTACGAATAA
TATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTAGAGAATCATATAAA
TGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTGACAACAGG
ACTCTACAGTTATCTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTGCAA
ATAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCATTATTAGTACATCCATTAG
GGTTAGGGTAATGGTTTATAGACTAATTTTAGTACATCTATT
ATTCTATTAGCCTCTAAATTAAGAAAACTAAAATCTATTAGTTT
TTATTTAATAGTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAGTGA
TAAACAAATACCCTTAAGAAATTAAAAAACTAAGGAAACATTTCCTT
```

GTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGCCGTCACGAGTCTAACG
 GACACCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTGGGCCAAGCGAACAGA
 CGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTGAGAGTTCCGCT
 CCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAG
 CGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCAGGCCTCCTCCTCACGGC
 ACCGGCAGCTACGGGGATTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCC
 TCGCCCGCCGTAATAAAATAGACACCCCCCTCCACACCCCTTTCCCCAAC
 TCGTGTGTCGGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCA
 CCCGTCGGCACCTCCGCTCAAGGTACGCCGCTCGCCTCCCCCCCC
 CCCCTCTCTACCTCTCTAGATCGCGTCCGGTCCATGCATGGTTAGGGC
 CCGTAGTTCTACTTCTGTCATGTTGTGTTAGATCCGTGTTGTGTTAG
 ATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTCAGACACG
 TTCTGATTGCTAACTGCCAGTGTCTCTTGGGAATCCTGGATGGCT
 CTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTCATGATTTTTGTTGTTGTTGC
 ATAGGGTTGGTTGCCCTTCCATTCAATATATGCCGTGCACTTG
 TTTGTCGGGTCACTTTCATGCTTTGGTCTGGTTGATGATGTGG
 TCTGGTTGGCGGTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTCAAACACTAC
 CTGGTGGATTATTAATTGGATCTGTATGTGTGCCATACATATTCA
 AGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTAT
 ACATGTTGATGCCGGTTTACTGATGCATACAGAGATGCTTTGTTG
 CTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGCGGTCTTCATTGTTCTAGAT
 CGGAGTAGAAACTGTTCAAACACCTGGTGTATTATTAATTGGAA
 CTGTATGTGTGTCATACATCTCATAGTTACGAGTTAAGATGGATGG
 AAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGTTACTGATGC
 ATATACATGATGCCATATGCAGCATCTATTCAATGCTAACCTGAGT
 ACCTATCTATTATAATAAACAGTATGTTATAATTATTCGATCTGAT
 ATACTGGATGATGCCATATGCAGCAGCTATATGTTGATTTAGGCC
 TGCCTTCATACGCTATTATGCTGGTACTGTTCTTGTGATGCTCA
 CCCTGTTGGTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 1)

[0084] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 como se segue:

CCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTAT

AAAAAAATTACCATATTTTTGTCACACTTATTGAAGTGTAGTTATC
TATCTCTACATATTTAAACTCACTCTACAAATAATATAGTCTATAA
TAECTAAAATAATATTAGTGTAGAGGATCATATAAATAAACTGCTAGA
CATGGTCTAAAGGATAATTGAATATTTGACAATCTACAGTTATCTTT
TAGTGTGCATGTGATCTCTGTTTTGCAAATAGCTTGACCTATATA
ATACTTCATCCATTATTAGTACATCCATTAGGATTAGGGTTGATGGT
TTCTATAGACTAATTTAGTACATCCATTATTCTTTAGTCTCTAATT
TTTTAAAACAAACTCTATTAGTTAGGTTAGGGTTGATGGT
AAATGAAATAAAATAATTGACTACAAATAAAACAAATACCCTTAAGA
AATAAAAAAACTAACGAAACATTTCCTGTTGAGTAGATAATGACAG
GCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAG
CAGCGTCGCGTCGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTGTAGC
TGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCCTGGACTTGCTCCGC
TGTGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCAC
GGCAGGCGGCCTCTCCTCCTCTCACGGCACCGCAGCTACGGGGATT
CTTCCCACCGCTCTCGCTTCCCTCGCCCCGCCGTAAATAATAGA
CACCCCTCCACACCCCTTTCCCCAACCTCGTGTTCGGAGCGCACA
CACACGCAACCAGATCTCCCCAAATCCAGCCGTCGGCACCTCCGCTTCA
AGGTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTCTAGATCGG
CGATCCGGCCATGGTTAGGGCCCGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGT
GTTAGAGCAAACATGTTCATGTTCATGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTG
GGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGGATACTGTTCAAGCTACCTGGTGG
TTTATTAATTGTATCTGTATGTGTGCCATACATCTCATAGTTACGA
GTTAAGATGATGGATGAAATATCGATCTAGGATAGGTACATGTTGA
TGCGGGTTTACTGATGCATACAGAGATGCTTTCTCGCTGGTTG
TGATGATATGGCTGGTTGGCGGCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTG
TTTCAAACACTGGTGGATTATTAAAGGGCGTTCTAGATCGGAGTAG
AAATCTGTTCAAACACTGGTGGATTATTAAAGGATCTGTATGTATG
TGCCTACATCTCATAGTTACGAGTTAAGATGATGGATGGAAATATCGA
TCTAGGATAGGTACATGTTGATGCGGGTTTACTGATGCATACAGA
GATGCTTTCTGCTGGTTGTGATGATGTGGCTGGTTGGCGGCGTT
CTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTGGTGGATTATTAAATT
TTGTATCTTATGTGTGCCATACATCTCATAGTTACGAGTTAAGATG

ATGGATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACTGTTGATGTGGGTTT
 ACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTGATATGCTCTAA
 CCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTATAATTATTTG
 ATCTTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATT
 TTAGCCCTGCCTTCATACGCTATTATTGCTGGTACTGTTCTTGTCC
 GATGCTCACCCCTGTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 2)

[0085] Os promotores aqui descritos foram caracterizados por clonagem e subsequente análise de homologia de sequência de DNA para identificação de específicas regiões do promotor (isto é, as regiões promotoras à montante, 5'-UTR, e ítron). São providos construtos e processos usando um promotor Ubi-1 de *Z. mays* constitutivo comprendendo sequências de polinucleotídeos de uma região promotora à montante, região líder ou 5'-UTR, e um ítron para expressar transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos promotora – montante de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como se segue:

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCAT
 GTCTAAGTTATAAAAATTACCACATATTTCAGTCACACTGTTGAA
 GTGCAGTTATCTATCTTATACATATATTAAACTTACTCTACGAATAA
 TATAATCTATAGTACTACAATAATATCAGTGTAGAGAATCATATAAA
 TGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTGACAACAGG
 ACTCTACAGTTATCTTTAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTGCAA
 ATAGCTTCACCTATATAACTTCATCCATTATTAGTACATCCATTAG
 GGTTAGGGTAATGGTTTATAGACTAATTAGTTAGTACATCTATT
 ATTCTATTAGCTCTAAATTAAGAAAATCTATTAGTTAGTACATCTATT
 TTATTAATAGTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAGTACTAAAAAT
 TAAACAAATACCCTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTCCT
 GTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACG
 GACACCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTGGGCCAAGCGAACAGA
 CGGCACGGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTCCGCT
 CCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGCGCATCCAGAAATTGCGTGGCGAG
 CGGCAGACGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCCTCCTCCTCACGGC

ACCGGCAGCTACGGGGATTCTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCC
TCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO:
3)

[0086] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos promotora – montante de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 como se segue:

CCCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTAT
AAAAAAATTACCATATTGGTCACACTATTGAAGTGTAGTTATC
TATCTCTATACATATTTAAACTCACTACAATAATATAGTCTATAA
TACTAAAATAATATTAGTGTAGGAGCATATAAATAAACTGCTAGA
CATGGTCTAAAGGATAATTGAATATTTGACAATCTACAGTTATCTTT
TAGTGTGCATGTGATCTCTGTTTTGCAAATAGCTTGACCTATATA
ATACTTCATCCATTATTAGTACATCCATTAGGATTAGGGTTGATGGT
TTCTATAGACTAATTAGTACATCCATTATTCTTTAGTCTCTAATT
TTTTAAAACAAACTCTATTAGTTAGTACATCCATTATTAAATAATTAGATATA
AAATGAAATAAAATAATTGACTACAAATAAAACAAATACCCTTAAGA
AATAAAAAAAACTAACGAAACATTCTGTTGAGTAGATAATGACAG
GCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCA
CAGCGTCGCGTCGGCCAAGCGAACGAGCACGGCATCTCTGTAGC
TGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGC
TGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCAC
GGCAGGCGGCCTCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATT
CTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCCCGTAATAATAGA
CACCCCCCTCCACACCCTCTT (SEQ ID NO: 4)

Adicionais Elementos Reguladores de Gene

[0087] Expressão de transgene também pode ser regulada por uma região ítron e/ou 5'-UTR localizada 3' à jusante da sequência promotora – montante. Um promotor compreendendo uma região promotora – montante ligada operavelmente a uma 5'-UTR e/ou ítron pode regular expressão de transgene. Embora um promotor - montante seja necessário para dirigir transcrição, a presença de uma 5'-UTR e/ou ítron pode aumentar níveis de expressão resultando na produ-

ção de mais transcritos mRNA para tradução e síntese de proteína. Adição de uma 5'-UTR e/ou um ítron a uma sequência de polinucleotídeos promotora – montante pode auxiliar expressão estável de um transgene.

[0088] Em adição, um promotor constitutivo compreendendo uma sequência de polinucleotídeos promotora – montante pode ser seguido por uma 5'-UTR ou região líder para auxiliar na expressão de transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma 5'-UTR ou sequência de polinucleotídeos líder de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como se segue:

TCCCCAACCTCGTGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCC
CCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 5)

[0089] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma 5'-UTR ou sequência de polinucleotídeos líder de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 como se segue:

TCCCCAACCTCGTGGAGCGCACACACACGCAACCAGATCTCC
CCCAAATCCAGCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 6)

[0090] Ainda, um promotor constitutivo compreendendo uma sequência de polinucleotídeos promotora – montante seguida por uma 5'-UTR ou região líder também pode ser seguido por um ítron para auxiliar em expressão de transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo intrônica de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como se segue:

GTACGCCGCTCGCCTCCCCCCCCCCCTCTACCTCTAGATCG
GCGTTCCGGTCCATGCATGGTAGGGCCCGTAGTTCTACTCTGTTCATG
TTTGTGTTAGATCCGTGTTGTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACA
CGGATGCGACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTGCCAGTGT
TTCTCTTGGGAATCCTGGATGGCTCTAGCCGTTCCGAGACGGGATC
GATTTCATGATTTTTTGTGATGCTAGGGTTGGTTGCCCTTTCC
TTTATTCAATATGCCGTGCAGTGTTGTCGGGCATCTTTCATGCTT
TTTTTGCTTGGTTGTGATGATGTGGCTGGTTGGCGGTAGAT

CGGAGTAGAATTCTGTTCAAACACTACCTGGTGGATTATTAATTGGATC
 TGTATGTGTGCCATACATATTACATAGTACGAATTGAAGATGATGGAT
 GGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCAGGTTTACTGAT
 GCATATACAGAGATGCTTTGTCGCTGGTGTGATGATGTGGTGTGGT
 TGGGCGGTCGTTCAATTGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAAC
 ACCTGGTGTATTATTAATTGGAACTGTATGTGTGTCATACATCTTC
 ATAGTTACGAGTTAACAGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATAC
 ATGTTGATGTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCAT
 CTATTCAATGCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTAT
 GTTTATAATTATTGATCTTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCA
 GCTATATGTGGATTTAGCCCTGCCTCATACGCTATTATTCGCTTG
 GTACTGTTCTTGTGATGCTCACCTGTTGGTGTACTCTGCA
 (SEQ ID NO: 7)

[0091] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos intrônica de gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 como se segue:

GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTCTAGATCGGCG
 ATCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGTG
 TAGAGCAAACATGTTCATGTTCATGTTGTGATGATGTGGCTGGTTGGG
 CGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGGAACTGTTCAAGCTACCTGGTGGATT
 TATTAATTGTATCTGTATGTGTGCCATACATCTCATAGTTACGAGT
 TTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATG
 CGGGTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTCTCGCTGGTGTG
 ATGATATGGTCTGGTTGGCGGTGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTT
 TCAAACACTGGTGGATTATTAAAGGGCGTTAGATCGGAGTAGAA
 TACTGTTCAAACACTGGTGGATTATTAAAGGATCTGTATGTATGTC
 CTACATCTCATAGTTACGAGTTAACATGATGGATGGAAATATCGATCT
 AGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTACTGATGCATATACAGAGAT
 GCTTTCTCGCTGGTGTGATGATGTGGCTGGTGGCGGTGTTCTA
 GATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTGGTGGATTATTAAATTG
 TATCTTATGTGTGCCATACATCTCATAGTTACGAGTTAACATGATG
 GATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTACT
 GATGCATATACATGATGGCATATGCGGCATCTATTCAATGCTAACCT

TGAGTACCTATCTATTATAATAAACAAAGTATGTTTATAATTATTTGATC
TTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTA
GCCCTGCCTTCATACGCTATTATTGCTTGGTACTGTTCTTTGTCCGAT
GCTCACCCCTGTTGGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 8)

Cassetes de Expressão de Gene Repórter e Transgene

[0092] Expressão de transgene também pode ser regulada através de um cassete de expressão de gene. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1 de uma planta. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1 de *Z. mays* C.v. B104.

[0093] Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, onde o promotor é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, ou 100% idêntico a SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor constitutivo, tal como o promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, que está operavelmente ligado a um gene repórter ou um transgene. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor constitutivo que está operavelmente ligado a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreendendo o promotor constitutivo pode dirigir expressão de um ou mais transgenes ou genes repórteres. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreendendo o promotor constitutivo pode dirigir expressão de dois ou mais transgenes ou genes repórteres.

[0094] Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, onde a sequência promotora – montante é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor constitutivo, tal como o promotor – montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, que está operavelmente ligado a um gene repórter ou um transgene. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor – montante constitutivo que está operavelmente ligado a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreendendo o promotor – montante constitutivo pode direcionar expressão de um ou mais transgenes ou genes repórteres. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreendendo o promotor – montante constitutivo pode dirigir a expressão de dois ou mais transgenes ou genes repórteres. Ainda em uma modalidade, o promotor – montante pode compreender um ítron. Em uma modalidade o promotor – montante pode compreender uma sequência ítron que está operavelmente ligada a um gene repórter ou transgene. Em uma outra modalidade, o promotor – montante pode compreender uma 5'-UTR ou sequência líder. Em uma modalidade o promotor – montante pode compreender uma 5'-UTR ou sequência líder que está operavelmente ligada a um gene repórter ou transgene. Ainda em uma outra modalidade o promotor – montante pode compreender uma 5'-UTR ou sequência líder e uma sequência ítron. Em uma modalidade o promotor – montante pode compreender

uma 5'-UTR ou sequência líder e uma sequência ítron que estão operavelmente ligadas a um gene repórter ou transgene.

[0095] Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, onde a 5'-UTR ou sequência líder é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 6. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende uma 5'-UTR ou sequência líder de um gene de milho codificando uma proteína Ubiquitina-1 que está operavelmente ligada a um promotor, onde o promotor é um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, promotor Ubiquitina-1 de *Zea mays*), um vírus (por exemplo, promotor vírus mosaico de nervura de mandioca), ou bactérias (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão de gene compreende 5'-UTR de *Z. mays* c.v. B104 ou sequência líder de um gene de milho codificando uma proteína Ubiquitina que está operavelmente ligada a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações.

[0096] Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, onde a sequência intrônica é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,8%, ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 8. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um ítron de um gene de milho codificando uma proteína Ubiquitina-1 que está operavelmente ligado a um promotor, onde o promotor é um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, ou um promotor que se origina

de uma planta (por exemplo, promotor Ubiquitina-1 de Zea mays c.v. B104), um vírus (por exemplo, promotor vírus mosaico de nervura de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, Agrobacterium tumefaciens delta mas). Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão de gene compreende um ítron de um gene de milho codificando uma proteína Ubiquitina que está operavelmente ligado a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações.

[0097] Em uma modalidade, um vetor pode compreender um cassete de expressão de gene como aqui descrito. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma artificial bacteriano (BAC), um bacteriófago, um vírus, ou um fragmento de polinucleotídeo excisado para uso em transformação direta ou alvejamento de gene, tal como um doador de DNA.

[0098] Em uma modalidade, uma célula ou planta compreende um cassete de expressão de gene como aqui descrito. Em uma modalidade, uma célula ou planta compreende um vetor compreendendo um cassete de expressão de gene como mostrado neste pedido de patente. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma artificial bacteriano (BAC), um bacteriófago, ou um vírus. Pelo que, uma célula ou planta compreendendo um cassete de expressão de gene é uma célula transgênica ou uma planta transgênica, respectivamente.

[0099] Em uma modalidade, uma planta transgênica pode ser uma planta monocotiledônea ou uma dicotiledônea. Uma modalidade de uma planta monocotiledônea transgênica pode ser, mas não é limitada a, milho, trigo, arroz, sorgo, aveias, centeio, bananas, cana-de-açúcar,

e painço. Uma modalidade de uma planta dicotiledônea transgênica pode ser, mas não é limitado a, soja, algodão, girassol ou canola. Uma modalidade inclui também uma semente transgênica de uma planta transgênica, como aqui descrita.

Marcadores Selecionáveis

[00100] Vários marcadores selecionáveis, também descritos como genes repórteres, podem ser incorporados em um escolhido vetor de expressão para permitir identificação e seleção de plantas transformadas (“transformantes”). Muitos processos são disponíveis para confirmar expressão de marcadores selecionáveis em plantas transformadas, incluindo, por exemplo, sequenciamento de DNA e Reação de Cadeia Polimerase (PCR), Southern blotting, RNA blotting, processos imunológicos para detecção de uma proteína expressa a partir do vetor, tal como proteína precipitada, que media resistência a fosfinotricina, ou observação visual de outras proteínas tais como genes repórteres codificando beta-glicuronidase (GUS), luciferase, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarela (YFP), DsRed, beta-galactosidase, cloranfenicol acetil transferase (CAT), fosfatase alcalina, e semelhantes (Ver Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001), o conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade).

[00101] Genes marcadores selecionáveis são utilizados para seleção de células ou tecidos transformados. Genes marcadores selecionáveis incluem genes codificando resistência a antibiótico, tais como aqueles codificando neomicina fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT) assim como genes conferindo resistência a compostos herbicidas. Genes de resistência a herbicidas genericamente codificam uma proteína alvo modificada insensível para o herbicida ou para uma enzima que degrada ou detoxifica o herbicida na

planta antes dele poder atuar. Por exemplo, resistência a glifosato tem sido obtida através de uso de genes codificando enzimas alvos mutantes, 5-enol piruvil shikimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Genes e mutantes para EPSPS são bem conhecidos, e ainda descritos abaixo. Resistência para glufosinato de amônio, bromoxinila, e 2,4-dicloro fenóxi acetato (2,4-D) foram obtidas através de uso de genes bacterianos codificando pat ou DSM-2, uma nitrilase, e gene aad-1 ou um aad-12, que detoxifica os respectivos herbicidas.

[00102] Em uma modalidade, herbicidas podem inibir o ponto de crescimento ou meristema, incluindo imidazolinona ou sulfonil ureia, e genes para resistência / tolerância de aceto hidróxi ácido sintase (A-HAS) e acetolactato sintase (ALS). Genes de resistência a glifosato incluem genes 5-enol piruvil shikimato-3-fosfato sintase (EPSPs) mutante e dgt-28 via introdução de ácidos nucleicos recombinantes e/ou várias formas de mutagênese in vivo de genes EPSPs nativos, genes aroA, e genes glifosato acetil transferase (GAT), respectivamente. Genes de resistência para outros compostos fosfono incluem genes BAR de espécies *Streptomyces*, incluindo *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces viridichromogenes*, e ácidos piridino ou fenóxi propiônicos e ciclo-hexonas (genes codificando inibidor de ACCase). Genes exemplares conferindo resistência a ciclo-hexanodionas e/ou ácido arilóxi fenóxi propanoico (incluindo haloxifope, diclofope, fenxoprope, fluazifope, quizalofope) incluem genes de acetil coenzima A carboxilase (ACCase)-Acc1-S1, Acc1-S2 e Acc1-S3. Em uma modalidade, herbicidas podem inibir fotossíntese, incluindo triazina (genes psbA e 1s+) ou benzonitrila (gene nitrilase).

[00103] Em uma modalidade, genes marcadores selecionáveis incluem, mas não são limitados a genes codificando: neomicina fosfo-transferase II; cianamida hidratase; aspartato cinase; diidro picolinato sintase; triptofano descarboxilase; diidro dipicolinato sintase e asparta-

to sintase dessensibilizada; gene bar; triptofano descarboxilase; neomicina fosfotransferase (NEO); higromicinafosfotransferase (HPT ou HYG); di-hidro folato redutase (DHFR); fosfinotricina acetil transferase; ácido 2,2-dicloro propiônico desalogenase; aceto hidroxiácido sintase; 5-enol piruvil shikimato fosfato sintase (aroA); halo aril nitrilase; acetil coenzima A carboxilase; di-hidro pteroato sintase (sul I); e polipeptídeo foto sistema (psbA) de 32 kD.

[00104] Uma modalidade também pode incluir genes codificando resistência para: cloranfenicol; metotrexato; higromicina; spectinomicina; bromoxinil; glifosato; e fosfinotricina.

[00105] A lista acima de genes marcadores selecionáveis não é pretendida ser limitante. Qualquer gene marcador selecionável ou répórter é abrangido pela presente invenção.

[00106] Genes marcadores selecionáveis são sintetizados para ótima expressão em planta. Por exemplo, em uma modalidade, uma sequência codificante de um gene foi modificada através de otimização de códon para aperfeiçoar expressão em plantas. Um gene marcador selecionável pode ser otimizado para expressão em uma particular espécie de planta ou alternativamente pode ser modificado para ótima expressão em plantas dicotiledôneas ou monocotiledôneas. Códons preferidos de plantas podem ser determinados a partir de códons de frequência mais alta nas proteínas expressas na maior quantidade nas particulares espécies de plantas de interesse. Em uma modalidade, um gene marcador selecionável é designado para ser expresso em plantas em maior nível resultando em maior eficiência de transformação. Processos para otimização de genes de plantas são bem conhecidos. Orientação com relação a otimização e fabricação de sequências de polinucleotídeos sintéticos podem ser encontrados em, por exemplo, WO2013/016546, WO2011/146524, WO1997/013402, patente US 6 166 302, e patente US 5 380 831, aqui incorporadas por referência.

cia.

Transgenes

[00107] Os processos e composições mostrados podem ser usados para expressão de sequências de gene polinucleotídeos dentro de genoma de planta. Da mesma maneira, genes codificando tolerância a herbicida, resistência a insetos, nutrientes, antibióticos, ou moléculas terapêuticas podem ser expressos através do novo promotor.

[00108] Em uma modalidade o elemento regulador promotor constitutivo da presente exposição é combinado ou operavelmente ligado com um ou mais genes codificando sequências de polinucleotídeos que proporcionam resistência ou tolerância a glifosato, 2,4-D-glufosinato, ou um outro herbicida, provê resistência para insetos selecionados ou doenças e/ou aperfeiçoamento nutricional, aperfeiçoadas características agronômicas, proteínas, ou outros produtos úteis em alimentação, alimento, industrial, farmacêutico ou outros usos. Os transgenes podem ser “empilhados” com duas ou mais sequências de ácidos nucleicos de interesse dentro de um genoma de planta. Empilhamento pode ser realizado, por exemplo, via convencional cultivo de planta usando dois ou mais eventos, transformação de uma planta com um construto que contém as sequências de interesse, retransformação de uma planta transgênica, ou adição de novas características através de integração alvejada via recombinação homóloga.

[00109] Tais sequências de polinucleotídeos de interesse incluem, mas não são limitadas àqueles exemplos providos abaixo:

1. Genes ou Sequências Codificantes (por exemplo, iRNA) Que Conferem Resistência a Pestes ou Doenças

[00110] (A) Genes de resistência a doença de planta. Defesas de plantas são frequentemente ativadas por específica interação entre o produto de um gene de resistência a doença (R) na planta e o produto de um correspondente gene de avirulência (Avr) no patógeno. Uma

variedade de plantas pode ser transformada com gene de resistência clonado para engenheirar plantas que são resistentes a específicas linhagens de patógenos. Exemplos de tais genes incluem, o gene Cf-9 de tomate para resistência a *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994 Science 266:789), gene Pto de tomate, que codifica uma proteína cinase, para resistência a *Pseudomonas syringae* pv. Tomato (Martin et al., 1993 Science 262:1432), e gene RSSP2 de *Arabidopsis* para resistência a *Pseudomonas syringae* (Mindrinos et al., 1994 Cell 78:1089).

[00111] (B) Uma proteína de *Bacillus thuringiensis*, um seu derivado ou um polipeptídeo sintético modelado sobre a mesma, tal como, uma sequência de nucleotídeos de um gene Bt δ-endotoxina (Geiser et al., 1986 Gene 48:109), e um gene inseticida vegetativo (VIP) (ver, por exemplo, Estruch et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94). Além disso, moléculas de DNA codificando genes δ-endotoxina podem ser adquiridas de American Type Culture Collection (Rockville, Md.), sob ATCC accession numbers 40098, 67136, 31995 e 31998.

[00112] (C) Uma lectina, tal como, sequências de nucleotídeos de vários genes lectina de ligação – manose de *Clivia miniata* (Van Damme et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:825).

[00113] (D) Uma proteína de ligação a vitamina, tal como avidina e homólogos de avidina que são úteis como larvicidas contra pestes de insetos. Ver patente U.S. 5 659 026.

[00114] (E) Um inibidor de enzima, por exemplo, um inibidor de protease ou um inibidor de amilase. Exemplos de tais genes incluem um inibidor de cisteína proteinase de arroz (Abe et al., 1987 J. Biol. Chem. 262:16793), um inibidor I de proteinase de tabaco (Huub et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:985), e um inibidor de alfa amilase (Sumitani et al., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243).

[00115] (F) Um hormônio ou feromônio específico de inseto tal como um ecdisteroide e uma sua variante de hormônio juvenil, um

mimético baseado no mesmo, ou um seu antagonista ou agonista, tal como expressão de baculovírus de esterase de hormônio juvenil clonada, um inativador de hormônio juvenil (Hammock et al., 1990 Nature 344:458).

[00116] (G) Um peptídeo ou neuropeptídeo específico de inseto que, com expressão, interrompe a fisiologia da peste afetada (J. Biol. Chem. 269:9). Exemplos de tais genes incluem um receptor de hormônio diurético de inseto (Regan, 1994), uma alostatina identificada em *Diptoptera punctata* (Pratt, 1989), e neutotoxinas paralíticas, específicas de insetos (patente U.S. 5 266 361).

[00117] (H) Um veneno específico de inseto produzido em natureza por uma cobra, uma vespa, etc., tal como peptídeo inseto-tóxico de escorpião (Pang, 1992 Gene 116:165).

[00118] (I) Uma enzima responsável por uma hiper-acumulação de monoterpeno, um sesquiterpeno, um esteroide, ácido hidroxâmico, um derivado fenil propanoide, ou uma outra molécula não proteína com atividade inseticida.

[00119] (J) Uma enzima envolvida na modificação, incluindo a modificação pós-tradução, de uma molécula biologicamente ativa; por exemplo, enzima glicolítica, uma enzima proteolítica, uma enzima lipolítica, uma nucleasse, uma ciclase, uma transaminase, uma esterase, uma hidrolase, uma fosfatase, uma cinase, uma fosforilase, uma polimerase, uma elastase, uma quitinase, e uma glicanase, se natural ou sintética. Exemplos de tais genes incluem, um gene callas (pedido de patente publicado PCT WO93/02197), sequências codificando quitinase (que podem ser obtidas, por exemplo, a partir de ATCC sob os números de acesso 3999637 e 67152), quitinase de nematoides de tabaco (Kramer et al., 1993 Insect Molec. Biol. 23:691), e gene poliUbiquitina ubi4-2 de salsa (Kawalleck et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:673).

[00120] (K) Uma molécula que estimula transdução de sinal. E-

xemplos de tais moléculas incluem sequências de nucleotídeos para clones de cDNA de mung calmodulina de feijão (Botella et al., 1994 Plant Molec. Bio. 24:757) e uma sequência de nucleotídeos de um clone cDNA de calmodulina de milho (Giess et al., 1994 Plant Physiol. 104:1467).

[00121] (L) Um peptídeo momento hidrofóbico. Ver patente U.S.N^{os}. 5 659 026 e 5 607 914; a última ensina peptídeos antimicrobianos sintéticos que conferem resistência a doença.

[00122] (M) Uma permeasse de membrana, um formador de canal ou um bloqueador de canal, tal como análogo peptídeo lítico cecropina-beta (Jaynes et al., 1993 Plant Sci. 89:43) que torna plantas de tabaco transgênicas resistentes a Pseudomonas solanacearum.

[00123] (N) Uma proteína invasiva – viral ou uma toxina complexa derivada da mesma. Por exemplo, a acumulação de proteínas de revestimento viral em células de plantas transformadas proporciona resistência a infecção viral e/ou desenvolvimento de doença efetuado pelo vírus do qual o gene de proteína de revestimento é derivado, assim como através de vírus relacionados. Resistência mediada por proteína de revestimento foi conferida sobre plantas transformadas contra vírus de mosaico de alfafa, vírus mosaico de pepino, vírus de estria de tabaco, vírus X de batata, vírus Y de batata, vírus de gravação de tabaco, vírus rattle de tabaco, e vírus mosaico de tabaco. Ver, por exemplo, Beachy et al. (1990) Ann. Ver. Phytopathol. 28:451.

[00124] (O) Um anticorpo específico – inseto ou uma imunotoxina derivada do mesmo. Assim, um anticorpo alvejado para uma função metabólica crítica no estômago de inseto pode inativar uma enzima afetada, matando o inseto. Por exemplo, Taylor et al. (1994) Abstract #497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions mostra inativação enzimática em tabaco transgênico via produção de fragmentos de anticorpos de cadeia simples.

[00125] (P) Um anticorpo específico – vírus. Ver, por exemplo, Tavladoraki et al. (1993) Nature 266:469, que mostra que plantas transgênicas expressando genes de anticorpo recombinantes são protegidas de ataque de vírus.

[00126] (Q) Uma proteína paralisante de desenvolvimento produzida em natureza por um patógeno ou um parasita. Assim, endo alfa-1,4-D poligalacturonases de fungos facilitam colonização de fungos e liberação de nutriente de planta através de solubilização de homo alfa-1,4-D-galacturonase de parede de célula de planta (Lamb et al., 1992) Bio/Technology 10:1436. A clonagem e caracterização de um gene que codifica uma proteína de inibição de endo poligalacturonase de feijão é descrita por Toubart et al. (1992 Plant J. 2:367).

[00127] (R) Uma proteína de paralisação de desenvolvimento produzida em natureza por uma planta, tal como o gene de inativação de ribossoma de cevada que provê uma resistência aumentada para doenças de fungos (Longemann et al., 1992). Bio/Technology 10:3305.

[00128] (S) RNA interferência, onde uma molécula de RNA é usada para inibir expressão de um gene-alvo. Uma molécula de RNA em um exemplo é parcialmente ou inteiramente de fita dupla, que dispara uma resposta de silenciamento, resultando em clivagem de dsRNA em pequenos RNAs interferentes, que são então incorporados em um complexo alvejante que destrói mRNAs homólogos. Ver, por exemplo, Fire et al., patente U.S. 6 506 559; Graham et al., patente U.S. 6 573 099.

2. Genes Que Conferem Resistência a um Herbicida

[00129] (A) Genes codificando resistência ou tolerância a um herbicida que inibe o ponto de crescimento ou meristema, tal como um herbicida imidazolinona, sulfonanilida ou sulfonil ureia. Genes exemplares nesta categoria codificam acetolactato sintase mutante (ALS) (Lee et al., 1988 EMBOJ. 7:1241) também conhecida como enzima

aceto hidroxiácido sintase (AHAS) (Miki et al., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

[00130] (B) Um ou mais adicionais genes codificando resistência ou tolerância a glifosato proporcionada por genes aroA e EPSP sintase mutantes, ou através de inativação metabólica por genes tais como DGT-28, 2mEPSPS, GAT (glifosato acetil transferase) ou GOX (glifosato oxidase) e outros compostos fosfono como glufosinato (genes pat, bar, e dsm-2), e ácidos ariloxifenoxipropiônicos e ciclo hexanodionas (genes codificando inibidor de ACCase). Ver, por exemplo, patente U.S. 4 940 835, que mostra a sequência de nucleotídeos de uma forma de EPSP que pode conferir resistência a glifosato. Uma molécula de DNA codificando um gene aroA mutante pode ser obtida sob ATCC número de acesso 39256, e a sequência de nucleotídeos do gene mutante é mostrada em patente U.S. 4 769 061. O pedido de patente EP 0 333 033 e patente U.S. 4 975 374 mostram sequências de nucleotídeos de genes glutamina sintase que conferem resistência a herbicidas como L-fosfinotricina. A sequência de nucleotídeos de um gene fosfinotricina acetil transferase é provida no pedido de patente EP 0 242 246. De Greef et al. (1989) Bio/Technology 7:61 descreve a produção de plantas transgênicas que expressam genes bar quiméricos codificando atividade de fosfinotricina acetil transferase. Genes exemplares conferindo resistência a ácidos ariloxifenoxipropiônicos e ciclo hexanodionas, tais como setoxidim e haloxifope, são os genes Accl-S1, Accl-S2 e Accl-S3 descritos por Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

[00131] (C) Genes codificando resistência ou tolerância a um herbicida que inibe fotossíntese, tal como uma triazina (genes psbA egs+) e uma benzonitrila (gene nitrilase). Przibilla et al. (1991) Plant Cell 3:169 descreve o uso de plasmídeos codificando genes psbA mutantes para transformação de Chlamydomonas. Sequências de nucleotí-

deos para genes nitrilase são mostradas na patente U.S. 4 810 648, e moléculas de DNA contendo estes genes são disponíveis sob ATCC accession numbers 53435, 67441 e 67442. Clonagem e expressão de DNA codificando uma glutationa S-transferase são descritas por Hayes et al. (1992) Biochem. J. 285:173.

[00132] (D) Genes codificando resistência ou tolerância a um herbicida que se liga a hidroxifenil piruvato dioxigenases (HPPD), enzimas que catalisam a reação na qual para hidroxifenil piruvato (HPP) é transformado em homogentisato. Isto inclui herbicidas como isoxazóis (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, patente U.S. 5 424 276), em particular isoxaflutol, que é um herbicida seletivo para milho, dicetonitrilas (EP496630, EP496631), em particular 2-ciano-3-ciclo propil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃ fenil) propano-1,3-diona e 2-ciano-3-ciclo propil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂ fenil) propano-1,3-diona, tricetonas (EP625505, EP625508, patente US 5 506 195), em particular sulcotrionas, e pirazolinatos. Um gene que produz uma superabundância de HPPD em plantas pode prover tolerância ou resistência a tais herbicidas, incluindo, por exemplo, genes descritos nas patentes U.S. N^{os}. 6 268 549 e 6 245 968 e publicação de pedido de patente U.S. N^o. 2003/0066102.

[00133] (E) Genes codificando resistência ou tolerância a herbicidas fenoxiauxina, como ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D) e que também pode conferir resistência ou tolerância a herbicidas ariloxifenoxypropionato (AOPP). Exemplos de tais genes incluem o gene de enzima dioxigenase dependente de -cetoglutarato (aad-1), descrito na patente U.S. 7 838 733.

[00134] (F) Genes codificando resistência ou tolerância a herbicidas fenoxiauxina, tal como ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D) e que também podem conferir resistência ou tolerância a herbicidas pirodioxiauxina, tais como fluroxipir ou triclopir. Exemplos de tais genes

incluem o gene de enzima dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato (aad-12), descrito no WO2007/053482 A2.

[00135] (G) Genes codificando resistência ou tolerância a dicamba (ver, por exemplo, publicação de patente U.S. 20030135879).

[00136] (H) Genes provendo resistência ou tolerância para herbicidas que inibem protoporfirinogênio oxidase (PPO) (ver patente U.S. 5 767 373).

[00137] (I) Genes provendo resistência ou tolerância para herbicidas triazina (como atrazina) e herbicidas derivados de ureia (como diuron) que se ligam a proteínas de núcleo de centros de reação de foto-sistema II (OS II) (Ver Brusslan et al., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245.

3. Genes Que Conferem ou Contribuem Para Uma Característica de Valor Adicionado

[00138] (A) Metabolismo de ácido graxo modificado, por exemplo, através de transformação de milho ou Brassica com um gene anti-sentido ou estearoil –ACP desaturase para aumentar teor de ácido estearíco da planta (Knultzon et al., 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:2624.

[00139] (B) Diminuído teor de fitase

[00140] (1) Introdução de gene codificando fitase, tal como o gene fitase de Aspergillus niger (Van Hartingsveldt et al., 1993 Gene 127:87), aperfeiçoa degradação de fitato, adicionando mais fosfato livre à planta transformada.

[00141] (2) Um gene pode ser introduzido que reduza teor de fitato. Em milho, isto, por exemplo, pode ser realizado através de clonagem e então reintrodução de DNA associado com o alelo simples que é responsável por mutantes de milho caracterizados por baixos níveis de ácido fítico (Raboy et al., 1990 Maydica 35:383).

[00142] (C) Composição de carboidrato modificada efetuada, por

exemplo, através de transformação de plantas com um gene codificando uma enzima que altera o padrão de ramificação de amido. Exemplos de tais enzimas incluem gene frutosil transferase de *Streptococcus mucus* (Shiroza et al., 1988) J. Bacteriol. 170:810, gene levan-sucrase de *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al., 1985 Mol Gen. Genel. 200:220), alfa amilase de *Bacillus licheniformis* (Pen et al., 1992 Bio/Technology 10:292), genes invertase de tomate (Elliot et al., 1993), gene amilase de cevada (Sogaard et al., 1993 J. Biol. Chem. 268:22480), e enzima de ramificação de amido de endosperma de milho II (Fisher et al., 1993 Plant Physiol. 102:10450).

Transformação

[00143] Apropriados processos para transformação de plantas incluem qualquer processo onde DNA possa ser introduzido em uma célula, por exemplo, e sem limitação: eletroporação (ver, por exemplo, patente U.S. 5 384 253); bombardeio com microprojétil (ver, por exemplo, patente U.S. 5 015 580; 5 550 318; 5 538 880; 6 160 208; 6 399 861; e 6 403 865); transformação mediada com *Agrobacterium* (ver, por exemplo, patente U.S. N°s. 5 635 055; 5 824 877; 5 591 616; 5 981 840; e 6 384 301); e transformação de protoplasto (ver, por exemplo, patente U.S. 5 508 184). Estes processos podem ser usados para transformação estável ou transformação transiente de uma planta.

[00144] Um construto de DNA pode ser introduzida diretamente no DNA genômico da célula de planta usando técnicas tais como agitação com fibras de carbeto de silício (ver, por exemplo, patente U.S. 5 302 523, e 5 464 765). Construtos de DNA podem ser diretamente introduzidos em tecido de planta usando processos biolítico, como bombardeio de partícula de DNA (ver, por exemplo, Klein et al., (1987) Nature 327:70-73). Alternativamente, construtos de DNA podem ser introduzidas na célula de planta via transformação de nanopartícula (ver, por exemplo, publicação de patente U.S. N° 2009/0104700, aqui incorpo-

rada por referência em sua totalidade).

[00145] Em adição, transferência de gene pode ser obtida usando bactérias ou vírus não Agrobacterium, tais como Rhizobium sp. N-GR234, Sinorhizobium meliloti, Mesorhizobium loti, vírus X de batata, vírus mosaico de couve-flor, vírus de estria de mandioca. e/ou vírus mosaico de tabaco, ver, por exemplo, Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4.

[00146] Através de aplicação de técnicas de transformação, células de virtualmente qualquer espécie de planta podem ser estavelmente transformadas, e estas células podem ser desenvolvidas em plantas transgênicas através de técnicas bem conhecidas. Por exemplo, técnicas que podem ser particularmente úteis no contexto de transformação de algodão são descritas nas patentes U.S. 5 846 797; 5 159 135; 5 004 863; e 6 624 344; técnicas para transformação de plantas Brassica em particular são descritas, por exemplo, na patente U.S. 5 750 871; técnicas para transformação de soja são descritas, por exemplo, na patente U.S. 6 384 301; e técnicas para transformação de milho são descritas, por exemplo, nas patentes U.S. N^{os}. 7 060 876 e 5 591 616, e publicação PCT Internacional WO95/06722.

[00147] Após efetuar liberação de um ácido nucleico exógeno para uma célula receptora, uma célula transformada é genericamente identificada para ainda cultura e regeneração de planta. De modo a aperfeiçoar a habilidade para identificar transformantes, pode-se desejar o emprego de um gene marcador selecionável com o vetor de transformação usado para gerar o transformante. Em uma modalidade ilustrativa, uma população de células transformadas pode ser ensaiada através de exposição de células a um agente ou agentes seletivos, ou as células podem ser selecionadas para a desejada característica de gene marcador.

[00148] Células que sobrevivem à exposição a um agente seletivo,

ou células que tiveram escore positivo em um ensaio de seleção, podem ser cultivadas em meios que suportam regeneração de plantas. Em uma modalidade, quaisquer meios de cultura de tecido de planta apropriados podem ser modificados através de inclusão de ainda substâncias, tais como reguladores de crescimento. Tecidos de plantas podem ser mantidos sobre meios básicos com reguladores de crescimento até suficiente tecido ser disponível para início de esforços de regeneração de planta. Alternativamente, seguindo repetidos ciclos de seleção manual, até a morfologia do tecido ser apropriada para regeneração (por exemplo, pelo menos 2 semanas), o tecido então pode ser transferido para meios que conduzem à formação de broto. Culturas são transferidas periodicamente até suficiente formação de brotos ter ocorrido. Uma vez brotos sejam formados, eles são transferidos para meios que conduzem à formação de raiz. Uma vez suficientes raízes sejam formadas, plantas podem ser transferidas para o solo para ainda crescimento e maturidade.

[00149] Para confirmar a presença de um desejado ácido nucleico compreendendo construtos providos em plantas em regeneração, uma variedade de ensaios podem ser realizados. Tais ensaios podem incluir: ensaios biológicos moleculares, tais como Southern e Northern blotting e PCR; ensaios bioquímicos, tal como detecção de presença de um produto proteína através de meios imunológicos, tais como, ELISA, western blots e/ou LC-MS(MS espectrofotometria) ou através de função enzimática, tal como, através de ensaios de parte de planta, tais como ensaios de folha, callus, ou pólen; e/ou análise do fenótipo da planta regenerada inteira.

[00150] Eventos transgênicos podem ser selecionados, por exemplo, através de amplificação PCR usando iniciadores oligonucleotídeos específicos para moléculas de ácido nucleico de interesse. Genotipificação com PCR é entendida incluir, mas não ser limitada a, amplifica-

ção PCR de DNA genômico derivado de tecido de planta hospedeira isolado e/ou purificado previsto conter uma molécula de ácido nucleico de interesse integrada no genoma, seguido por clonagem padrão, e análise de sequência de produtos de amplificação de PCR. Processos de genotipificação de PCR foram bem descritos (ver, por exemplo, Rios et al., (2002) Plant J. 32:243-53) e podem ser aplicados a DNA genômico derivado de quaisquer espécies de plantas ou tipo de tecido, incluindo culturas de células.

[00151] Combinações de iniciadores oligonucleotídeos que se ligam a ambas, sequência alvo e sequência introduzida, podem ser usadas sequencialmente ou multiplexadas em reações de amplificação PCR. Iniciadores oligonucleotídeos projetados para anelarem-se ao sítio alvo, sequências de ácidos nucleicos introduzidas, e/ou combinações dos dois tipos de sequências de ácidos nucleicos podem ser produzidos. Assim, estratégias de genotipificação de PCR podem incluir, por exemplo, e sem limitação: amplificação de sequências específicas no genoma de planta; amplificação de múltiplas sequências específicas no genoma de planta; amplificação de sequências não específicas no genoma de planta; e combinações de quaisquer das anteriores. Aqueles versados na técnica podem imaginar adicionais combinações de iniciadores e reações de amplificação para interrogar o genoma. Por exemplo, um conjunto de iniciadores oligonucleotídeos dianteiro e reverso pode ser projetado para anelar a sequência(s) de ácido nucleico específica para o exterior alvo de limites da sequência de ácido nucleico introduzida.

[00152] Iniciadores oligonucleotídeos dianteiros e reversos podem ser desenhados para anelarem especificamente a uma molécula de ácido nucleico introduzida, por exemplo, em uma sequência correspondendo a uma região codificante dentro de uma sequência de nucleotídeos de interesse ali compreendida, ou outras partes da molécula.

la de ácido nucleico. Iniciadores podem ser usados em conjunção com iniciadores aqui descritos. Iniciadores oligonucleotídeos podem ser sintetizados de acordo com uma desejada sequência e são comercialmente disponíveis (por exemplo, de Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). Amplificação pode ser seguida por clonagem e sequenciamento, ou por análise direta de sequência de produtos de amplificação. Em uma modalidade, iniciadores oligonucleotídeos específicos para o gene-alvo são empregados em amplificações PCR.

Processo de Expressão de um Transgene

[00153] Em uma modalidade, um processo de expressão de pelo menos um transgene em uma planta compreende crescimento de uma planta compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) ligado operavelmente a pelo menos um transgene. Em uma modalidade, um processo de expressão de pelo menos um transgene em um tecido de planta ou célula de planta compreende cultura de um tecido de planta ou célula de planta compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) ligado operavelmente a pelo menos um transgene.

[00154] Em uma modalidade, um processo de expressão de pelo menos um transgene em uma planta compreende crescimento de uma planta compreendendo um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) ligado operavelmente a pelo menos um transgene. Em uma outra modalidade, um processo de expressão de pelo menos um transgene em um tecido de planta ou célula de planta compreende cultura de um tecido de planta ou célula de planta compreendendo um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) ligado operavelmente a pelo menos um transgene.

[00155] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compre-

endendo um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) ligado operavelmente a um transgene, onde, o promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2) é compreendido por um promotor – montante (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), e um ítron (SEQ ID NO: 8). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor – montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), e um ítron (SEQ ID NO: 8). Em uma modalidade, uma planta, um tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor - montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) e um ítron (SEQ ID NO: 8) de um gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor – montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), e um ítron (SEQ ID NO: 8) de um gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104.

[00156] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. Em uma modalidade, um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 pode ser SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor, onde o promotor é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, ou 100% idêntico a SEQ ID NO:2. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor Ubi-1 *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um

promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA um transgene marcador selecionável, ou suas combinações.

[00157] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um promotor – montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. Em uma modalidade, um promotor – montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 pode ser SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor – montante, onde o promotor – montante é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, ou 100% idêntico a SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor – montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está ligado operavelmente a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor - montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações.

[00158] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende uma 5'-UTR ou sequência líder de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. Em uma modalidade, uma 5'-UTR ou sequência líder Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 pode ser um polinucleotídeo de SEQ

ID NO: 6. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene comprendendo uma 5'-UTR ou sequência líder, onde a 5'-UTR ou sequência líder é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 6. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende uma 5'-UTR ou sequência líder Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligada a um promotor, onde o promotor é um promotor Ubiquitina, ou um promotor que origina-se de uma planta (por exemplo, promotor Ubiquitina-1 de *Zea Mays*), um vírus (por exemplo, promotor de vírus mosaico de estria de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo uma 5'-UTR ou sequência líder de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está ligada operavelmente a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreendendo um cassete de expressão de gene compreendendo uma 5'-UTR ou líder Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligada a um transgene, onde o transgene pode ser um gene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações.

[00159] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um ítron Ubi-1. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um ítron Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um ítron, onde o ítron é pelo menos 80%,

85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, ou 100% idêntica a SEQ ID NO: 8. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um íntron Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um promotor, onde o promotor é um promotor ubiquitina, ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, promotor ubiquitina-1 de *Zea mays*), um vírus (por exemplo promotor de vírus mosaico de estria de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um íntron Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um íntron Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou combinações dos mesmos.

[00160] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um cassete de expressão de gene compreendendo um promotor – montante Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, íntron Ubi-1 e uma 5'-UTR Ubi-5 que estão operavelmente ligadas a um transgene. O promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104, íntron Ubi-1, e uma 5'-UTR Ubi-1 podem estar operavelmente ligadas a diferentes transgenes dentro de um cassete de expressão de genes quando um cassete de expressão de genes inclui dois ou mais transgenes. Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão de gene compreende um promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente liga-

do a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações. Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão de gene compreende um ítron Ubi -1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou suas combinações. Em uma modalidade, um cassete de expressão de gene compreende um ítron Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligado a um promotor, onde o promotor é um promotor Ubiquitina, ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, promotor Ubiquitina-1 de *Zea Mays*), um vírus (por exemplo, promotor de vírus mosaico de estria de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade i lustrativa, um cassete de expressão de gene compreende uma 5'-UTR Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 que está operavelmente ligada a um transgene, onde o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, um transgene marcador selecionável, ou uma combinação dos mesmos.

[00161] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um vetor compreendendo um elemento regulador de promotor de gene constitutivo como aqui mostrado. Em uma

modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um vetor compreendendo um elemento regulador promotor de gene constitutivo, como aqui mostrado, ligado operavelmente a um transgene. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta compreende um vetor compreendendo um cassete de expressão de gene, como aqui mostrado. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma artificial bacteriano (BAC), um bacteriófago, ou um fragmento de vírus.

[00162] Em uma modalidade, uma planta, um tecido de planta, ou célula de planta, de acordo com o processo aqui mostrado, pode ser monocotiledônea. A planta, tecido de planta, ou célula de planta monocotiledônea pode ser, mas não é limitada a milho, arroz, trigo, cana-de-açúcar, cevada, centeio, sorgo, orquídeas, bambus, banana, tabucas, lírios, aveia, cebola, painço, e híbrido de trigo e centeio. Em uma outra modalidade, uma planta, tecido de planta, ou célula de planta, de acordo com os processos aqui mostrados, pode ser dicotiledônea. A planta, tecido de planta, ou célula de planta dicotiledônea pode ser, mas não é limitada a colza, canola, mostarda Indiana, mostarda da Etiópia, soja, girassol, e algodão.

[00163] Com relação à produção de plantas geneticamente modificadas, processos para a engenharia genética de plantas são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, numerosos processos para transformação de plantas foram desenvolvidos, incluindo protocolos de transformação biológica e física para plantas dicotiledôneas assim como plantas monocotiledôneas (por exemplo, Goto-Fumiyuki *et al.*, *Nature Biotech* 17:282-286 (1999); Miki *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993)). Em adição, vetores e processos de cultura in vitro para célula de planta ou transformação de tecido e regeneração de plantas são disponíveis, por exemplo, em

Gruber et al., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R. and Thomson, J.E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 89-119 (1993).

[00164] Aqueles versados na técnica reconhecerão que após a sequência exógena ser estavelmente incorporada em plantas transgênicas e confirmada ser operável, ela pode ser introduzida em outras plantas através de cruzamento sexual. Qualquer um de um número de técnicas de cultivo padrão pode ser usada, dependendo das espécies a serem cruzadas.

[00165] Uma célula, raiz, folha, callus, pólen, tecido de planta transformada, ou planta pode ser identificada e isolada através de seleção ou separação de material de planta engenhada para características codificadas pelos genes marcadores presentes sobre o DNA transformante. Por exemplo, seleção pode ser realizada através de crescimento de material de planta engenhada sobre meios contendo uma quantidade inibidora de um antibiótico ou herbicida para o qual a construto de gene transformante confere resistência. Inda, células transformadas também podem ser identificadas através de seleção para as atividades de quaisquer genes marcadores visíveis (por exemplo, os genes YFP, GFP, beta-glicuronidase, Luciferase, ou C1) que possam estar presentes sobre os construtos de ácido nucleico recombinantes. Tais metodologias de seleção e separação são bem conhecidas por aqueles versados na técnica.

[00166] Processos físicos e bioquímicos também podem ser usados para identificação de plantas ou células de plantas transformantes contendo construtos de genes inseridos. Estes processos incluem, mas não são limitados a: 1) análises Southern ou amplificação PCR para detecção e determinação de estrutura da inserção de DNA recombinante; 2) Northern blot, proteção de S1 RNase, extensão – iniciador, , ou amplificação de PCR – transcriptase reversa para detecção e exa-

me de transcritos de RNA dos construtos de gene; 3) ensaios enzimáticos para detecção de atividade de enzima ou ribozima, onde tais produtos genes são codificados pelo construto de gene; 4) análise de sequenciamento de geração seguinte (NGS); ou 5) eletroforese de gel de proteína, técnicas de western blot, imunoprecipitação, ou ensaio imunoassorvente ligado – enzima (ELISA), onde os produtos de construto de gene são proteínas. Adicionais técnicas, tais como hibridização *in situ*, manchamento de enzima, e imunomanchamento, também podem ser usadas para detectar a presença ou expressão do construto recombinante em específicos órgãos e tecidos de plantas. Os processos para modalidade de todos estes ensaios são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

[00167] Efeitos de manipulação de gene usando os processos aqui mostrados podem ser observados através de, por exemplo, Northern blots do RNA (por exemplo, mRNA) isolado dos tecidos de interesse. Tipicamente, se o mRNA está presente ou a quantidade de mRNA aumentou, pode ser assumido que o correspondente transgene está sendo expresso. Outros processos de medição de atividade de gene e/ou polipeptídeo codificado podem ser usados. Diferentes tipos de ensaios enzimáticos podem ser usados, dependendo do substrato usado e o processo de detecção de aumento ou diminuição de um produto ou subproduto de reação. Em adição, os níveis de polipeptídeo expresso podem ser medidos imunoquimicamente, através de emprego de ELISA, RIA, EIA, e outros ensaios baseados em anticorpos bem conhecidos por aqueles versados na técnica, tal como, através de ensaios de detecção eletroforética (tanto com manchamento ou western blotting). Como um exemplo não limitante, a detecção das proteínas AAD-1 (ariloxialcanoato dioxigenase; ver WO 2005/107437) e PAT (fosfinotricina-N-acetyl-transferase) usando um ensaio ELISA é descrito na publicação de patente U.S. 20090093366 que é aqui incorporado

por referência em sua totalidade. O transgene também pode ser seletivamente expresso em alguns tipos de células ou tecidos da planta ou em alguns estágios de desenvolvimento. O transgene também pode ser substancialmente expresso em todos os tecidos de plantas e ao longo de seu inteiro ciclo de vida. Entretanto, qualquer modo de expressão combinatorial também é aplicável.

[00168] A presente exposição também abrange sementes das plantas transgênicas descritas acima, onde a semente compreende o gene repórter, transgene, ou cassete de expressão de gene. A presente exposição também abrange a progênie, clones, linhas de células, ou células das plantas transgênicas descritas acima, onde a dita progênie, clone, linha de células, ou célula compreende o gene repórter, transgene, construto de gene.

[00169] Embora a invenção tenha sido descrito com referência a específicos processos e modalidades, deve ser apreciado que várias modificações e mudanças podem ser feitas sem se fugir da invenção aqui descrita.

Exemplos

Exemplo 1: Identificação e Isolamento de Novo Promotor

[00170] Uma nova sequência promotora do gene Ubi-1 de *Zea mays* c.v. B104 foi amplificada usando Reação de Cadeia Polimerase (PCR). Oligonucleotídeos (Tabela 1) designados para amplificar o novo promotor, *Z. mays* c.v. B104, foram derivados de regiões conservadas da sequência promotora Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, que serviu como o controle. Um produto de PCR foi obtido de *Z. mays* c.v. B104 e foi caracterizado.

[00171] O produto de PCR compreendendo o novo promotor foi克lonado em vetores Topo usando Invitrogen Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit de acordo com instruções do fabricante. Um mapa de vetor mostrando o plasmídeo克lonado compreendendo o novo produto de

PCR promotor é provido. Plasmídeo pDAB105712 corresponde a *Z. mays* c.v. B104 (Figura 2).

Tabela 1: Iniciadores usados para amplificação PCR de novos promotores Ubi-1	
	SEQ ID NO:
Iniciador dianteiro: GCTACCGCGG <u>ACCCGGT</u> CGTGCCCCTCTAGAGATAATG	9
Iniciador reverso: AGTCAGGTACC <u>CTGCAGAAGTAACACCAAACAG</u>	10
A sequência específica – promotora dos iniciadores de PCR está sublinhada. A sequência iniciador localizada 5' a montante da sequência específica – promotora é sequência ligante usada para clonagem	

[00172] Após clonagem, a inserção promotora contendo o produto de PCR foi sequenciada usando processos conhecidos por aqueles versados na técnica. As sequências de polinucleotídeos promotoras de *Z. mays* c.v. B104 (Figura 4) foram alinhadas em computador e subsequentemente analisadas para homologia de sequência para a sequência controle Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figura 3). Processos de bioinformática e/ou programas de suporte lógico conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como ClustalW ou Sequencher, foram usados para realizar as análises de homologia de sequência.

Exemplo 2: Caracterização de novo promotor

[00173] Análise de homologia de sequência (Figuras 3-7), incluindo alinhamento de sequência e comparação à sequência controle Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 1; Figura 3) revelou uma nova sequência promotora Ubi-1, obtida de *Z. mays* c.v. B104 (SEQ ID NO: 2; Figura 4), compreendida por sequências de polinucleotídeos de três regiões distintas: 1) uma região promotora a montante (SEQ ID NO: 4); 2) uma 5'-UTR (SEQ ID NO: 6), e 3) um íntron (SEQ ID NO: 8). As regiões promotoras e elementos promotores específicos de *Z. mays* c.v. B104 foram analisados para homologia de sequência à sequência controle Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figuras 5-7). Mais especificamente, alinhamento de sequência foi realizado para comparar independentemente o promotor a montante, 5'-UTR, e regiões intrônicas, assim co-

mo a caixa TATA e Elemento de Choque Térmico (HSE), elementos reguladores do promotor *Z. mays* c.v. B104 para as correspondentes regiões da sequência controle Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figuras 5-7, Tabela 2).

Tabela 2: Homologia de sequências (%) entre promotor Ubi-1 de <i>Z. mays</i> c.v. B73 e novo promotor Ubi-1						
Promotor	Total	Promotor – montante	5'-UTR / Líder	Ítron	Caixa TATA	Elemento de Choque Térmico
<i>Z. mays</i> c.v. B104	85,7	93,4	96,4	78,2	100	100

[00174] A Figura 5 mostra o alinhamento de sequências das regiões promotoras – montante do promotor *Z. mays* c.v. B104 comparadas à região promotora – montante da sequência promotora controle Ubi-1 *Z. mays* c.v. B73. A Figura 6 mostra o alinhamento de sequência da 5'-UTR ou sequência líder do promotor *Z. mays* c.v. B104 comparada à 5'-UTR ou sequência líder da sequência promotora controle Ubi -1 de *Z. mays* c.v. B73. A Figura 7 mostra o alinhamento de sequências das regiões intrônicas do promotor *Z. mays* B104 comparadas à sequência intrônica da sequência promotora controle de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73.

[00175] Os elementos promotores obtidos de *Z. mays* B104 mostraram 85,7% de identidade de sequência total (Tabela 2) para a sequência de Ubi-1 de *Z. mays*. Caracterização da nova sequência promotora de *Z. mays* c.v. B104 confirmou que maioria dos elementos reguladores promotores (isto é, uma caixa TATA ou Elemento de Choque Térmico) tipicamente encontrados em um promotor funcional, também foram altamente conservados dentro de regiões promotoras de núcleo do promotor de *Z. mays* c.v. B104 (Tabela 2). Por exemplo, a Figura 5 mostra uma caixa TATA altamente conservada (pares de bases 869-876 mostrada em itálico e sublinhada) que foi identificada e verificada estar localizada aproximadamente 50 bp 5' a montante da TSS na re-

gião promotora – montante do novo promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104. Similarmente, a Figura 5 mostra duas sequências de Elemento de Choque Térmico (HSE) em sobreposição (pares de bases 457-481 mostrados como sublinhados e 482-500 mostrados em sublinhado duplo, respectivamente) foram conservadas no novo promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 analisado neste estudo e foram localizadas aproximadamente 200 pb 5' a montante da TSS.

[00176] Embora somente pequenos níveis de variação tenham sido observados na 5'-UTR ou sequência líder do novo promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 como comparada à sequência controle de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figura 6), áreas de menor conservação de sequência na região promotora – montante (Figura 5) e região ítron (Figura 7) também foram identificadas. De fato, maior parte da variação de sequência no promotor de *Z. mays* c.v. B104 foi especificamente contribuída pela sequência ítron, que mostrou somente 78,2% de similaridade de sequência para o ítron Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figura 7, Tabela 2). Em particular, uma corrida de 310 pb de polinucleotídeos localizados na extremidade 5' do ítron de *Z. mays* c.v. B104 foi a mais diversa (pares de bases 30-340), enquanto a extremidade 3' do ítron foi verificada ser bastante conservada (Figura 7). Ao contrário, as regiões promotoras – montante e 5'-UTR do promotor de *Z. mays* c.v. B104 foram relativamente conservadas (Figs. 5 e 6), tendo 93,4% e 96,4% de identidade de sequência para o promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, respectivamente (Tabela 2).

[00177] Em adição, ainda existem motivos reguladores na região de promotor – montante Ubi -1 de *Z. mays* que se estende 100-200 pb 5' montante da TSS. Estes motivos ligam fatores de transcrição que interagem com o complexo de iniciação de transcrição e facilitam sua montagem, aperfeiçoam sua estabilidade, ou aumentam a eficácia de escape de promotor uma vez a maquinaria transcricional desligue

(PEREMARTI et al. 2010). Assim, supressões, substituições, e desemparelhamentos dentro desta região reguladora afeta potencialmente ambas, resistência e especificidade de promotor.

Exemplo 3: Construto de vetor usando os novos promotores para expressão de gene

[00178] A menos que de outro modo indicado, manipulações biológicas e bioquímicas descritas neste e subsequentes Exemplos foram realizadas através de metodologias padrões como mostradas em, por exemplo, Ausubel et al. (1995), e Sambrook et al. (1989), e atualizações dos mesmos. As construtos usadas nos experimentos são descritas em maior detalhe abaixo (Tabela 3).

[00179] Os promotores de *Z. mays* compreendendo o promotor – montante, 5'-UTR, e regiões intrônicas, como previamente descritas, foram extraídos do gene Ubi-1 da espécie *Z. mays* e os amplicons de PCR foram purificados com gel usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Carlsbad, CA). A sequência de polinucleotídeos promotora foi então clonada em um Gateway Entry Vector (Invitrogen) usando técnicas de clonagem padrão conhecidas. O resultante Gateway Entry Vector compreendendo a sequência promotora Ubi-1 para *Z. mays* c.v. B104 foi confirmado vis digestão de restrição e sequenciamento. Um vetor entrada controle compreendendo a sequência promotora Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 também foi clonado em um vetor entrada de portão usando técnicas de clonagem padrões conhecidas.

[00180] Em adição às sequências promotoras Ubi-1, o vetor de entrada também compreendeu o gene repórter de proteína fluorescente amarela da espécie *Phialidium* (PhiYFP; Shagin, D.A., (2004) Mol Biol Evol. 21; 841-50) com um ítron ST-LS1 incorporado na sequência (Vancanneyt, G., (1990) Mol Gen Genet. 220; 245-50) e a região 3'-UTR do gene *Zea mays* Peroxidase 5 ((ZmPer5; patente U.S. 6 699 984). Mapas de vetores mostrando os vetores entradas clonados com-

preendendo cada uma das sequências promotoras são providos. Construto pDAB105742 corresponde ao vetor entrada controle compreendendo a sequência promotora de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. Construto pDAB105739 corresponde ao vetor entrada compreendendo sequência promotora de *Z. mays* c.v. B104. Assim, vetores entradas compreendendo cassetes de expressão de gene compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. mays*, o gene PhiYFP, e ZmPer5 3'-UTR foram estabelecidos.

[00181] Como descrito na Tabela 3, uma construto de vetor de expressão binário, compreendendo o gene repórter PhiYFP dirigido pela nova sequência promotora e terminada pela ZmPer5 3'-UTR, foi construída. Vetores de expressão ou transformação para transformação de embrião de milho mediada – Agrobacterium foram construídos através do uso de processos de clonagem padrões e reações de recombinação Gateway empregando um vetor binário de destinação padrão, pDAB101917, e os vetores de entrada compreendendo os cassetes de expressão de gene, como descrito acima.

[00182] O vetor de destinação binário, pDAB101917, compreendeu um gene de tolerância a herbicida, fosfinotricina acetil transferase (PAT; Wehrmann et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:1274-1278). No vetor pDAB101917, expressão de gene PAT estava sob o controle de um promotor Ubi-1 de *Z. mays*, 5'-UTR, e ítron. O vetor pDAB101917 também compreendeu uma região 3'-UTR do gene lipase de *Z. mays* (ZmLip; patente U.S. 7 179 902). A 3'-UTR de ZmLip foi usada para terminar transcrição do mRNA de PAT. A reação de recombinação Gateway permitiu a inserção de cada vetor de entrada compreendendo o cassete de expressão de gene (isto é, um promotor Ubi -1 de *Z. mays* c.v. B104 ou *Z. mays* c.v. B73, o gene PhiYFP, e a ZmPer5 3'-UTR) no vetor binário de destinação pDAB101917. Os vetores entradas foram inseridos no vetor de destinação pDAB101917 en-

tre bordas A e B T-DNA, e a montante do cassete de expressão PAT.

Tabela 3: Construto de vetor de expressão de gene binário

Construto de vetor binário	Construto de vetor de entrada			Construto de vetor de destinação			Figura
	Promotor	Trans-gene	3'-UTR	Promotor	Gene Re-pórter	3'-UTR	
pDAB105 748	<i>Z. mays</i> c.v. B73 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	8
pDAB105 745	<i>Z. mays</i> c.v. B104 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	<i>Z. mays</i> Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	9

[00183] Mapas vetores mostrando a construto de expressão binária, pDAB101917, com os cassetes de expressão de gene compreendidos por um promotor Ubi-1 de *Z. mays*, o gene *PhiYFP*, e a *ZmPer5* 3'-UTR incorporadas, são providos. Construto controle, pDAB105748, corresponde ao cassete de expressão de gene compreendendo o promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figura 8). Em adição, construto pDAB105745 corresponde ao cassete de expressão de gene compreendendo sequência promotora Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B104 (Figura 9).

Exemplo 4: Transformação de Planta

[00184] Construtos de vetores binários, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) e pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), foram cada uma transformadas em *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA101, usando técnicas padrões de transformação. Colônias bacterianas foram isoladas e DNA plasmídeo binário foi extraído, purificado, e confirmado via digestão com enzima de restrição.

[00185] Transformação de plantas de milho foi realizada de acordo com o protocolo descrito em Veja et al., 2008, Plant Cell Rep 27:297-305 que empregou transformação mediada com *Agrobacterium* e o gene fosfinotricina acetil transferase (PAT; Wehrmann et al., 1996, Nature Biotechnology 14:1274-1278) como um marcador de planta selecionável. Culturas de *Agrobacterium tumefaciens* compreendendo os construtos de vetor binário (descritas acima) foram usadas para transformar plantas *Z. mays* c.v. Hi-II e produzir primeiro round, T_0 , de eventos de milho transgênicos (Tabela 4). Os embriões zigóticos imaturos

foram produzidos, preparados, e colhidos 2,5 meses após transformação.

[00186] Resultados de transformações para os construtos de expressão de gene individuais são ainda descritos na Tabela 4. O número total de embriões produzidos, o número total de eventos transgênicos observados no estágio de callus e na planta total, assim como a porcentagem de eficiência de transformação total são mostrados. Eficiência de transformação total dos construtos de expressão binária é menor do que previamente reportado (Veja et al., 2008) devido a pobre vigor de embrião em muitos experimentos

Tabela 4: Primeiro round, T ₀ , resultados de transformação de milho				
Construto de vetor binário	Total # Embriões	Número de Callus	Número de eventos transgênicos	Eficiência (%)
pDAB105748	545	221	33	6,1
pDAB105745	454	227	25	5,5

Exemplo 5: Análise de número de cópias de transgene

[00187] Integração estável do transgene PhiYFP dentro de genoma das plantas de *Z.mays* transgênicas foi confirmada via um ensaio de sonda de hidrólise. Plântulas de *Z. mays* transgênicas estavelmente transformadas que desenvolveram a partir dos calli foram obtidas e analisadas para identificação de eventos que contiveram um baixo número de cópias (isto é, 1-2 cópias) de inserções fita-T de inteiro comprimento.

[00188] O sistema Roche Light Cycler 480 foi usado para determinar o número de cópias de transgene de acordo com instruções do fabricante. O processo utilizou uma reação PCR TaqMan bplexada que empregou oligonucleotídeos específicos para o gene PhiYFP e para o gene de referência endógeno, *Z. mays* Invertase (*ZmInv*; Genbank Accession No.: U16123.1), em um ensaio simples. Número de cópias e zigosidade foram determinados através de medição de intensidade de fluorescência específica – PhiYFP, em relação à fluorescên-

cia específica – ZmInv, como comparadas a conhecidos padrões de número de cópias.

[00189] Um fragmento de DNA específico – gene PhiYFP foi amplificado com um conjunto iniciador / sonda TaqMan contendo uma sonda marcada com corante fluorescente FAM, e ZmInv foi amplificado com um segundo conjunto de iniciador / sonda TaqMan contendo uma sonda marcada com fluorescência HEX (Tabela 5). Iniciadores e sondas para análise de número de cópias foram comercialmente sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). A metade fluorescente FAM foi excitada em uma densidade ótica de 465/510 nm, e a metade fluorescente HEX foi excitada em uma densidade ótica de 533/580 nm.

[00190] Reações PCR foram preparadas em um volume de reação final de 10 microlitros usando reagentes, como descrito na Tabela 6. Fragmentos de DNA específicos – gene foram amplificados de acordo com as condições de termociclagem mostradas na Tabela 7. Número de cópias e zigosidade das amostras foram determinados através de medição de intensidade relativa de fluorescência específica para o gene repórter, PhiYFP, para fluorescência específica para o gene referência, ZmInv, comparada a padrões de número de cópias conhecidos.

[00191] Padrões de número de cópias foram criados através de diluição de vetor, pDAB108706, em DNA genômico de *Z. mays* c.v. B104 (gDNA) para obter padrões com uma conhecida razão de pDAB108706:gDNA. Por exemplo, amostras tendo uma, duas, e quatro cópias de DNA vetor por uma cópia do gDNA de *Z. mays* c.v. B104 foram preparadas. Diluições de uma e duas cópias do pDAB108706 misturadas com o padrão gDNA de *Z. mays* c.v. B104, e um evento *Z. mays* controle que foi conhecido ser homozigoto (isto é, evento *Z. mays* 278; ver publicação de patente internacional PCT N° WO 2011/022469 A2).

[00192] Um ensaio de amplificação PCR bplexado TaqMan utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene PAT e o gene referência Zmlnv endógeno, respectivamente, foi realizado. Amplificação PCR para detectar um fragmento de DNA específico – gene para PAT com um conjunto iniciador TaqMan e uma sonda marcada com corante fluorescente FAM foi empregada (Tabela 5). Um segundo conjunto iniciador e uma sonda marcada com corante fluorescente HEX também foram usados para amplificar e detectar o gene controle / referência endógeno Zmlnv (Tabela 5). A mistura de reação TaqMan PAT foi preparada como mostrado na Tabela 6 e os específicos fragmentos foram amplificados de acordo com as condições mostradas na Tabela 7.

[00193] Resultados das análises de número de cópias de transgene de plantas transgênicas obtidas via transformação com diferentes construtos promotoras são mostrados em Tabela 8. Somente plantas com 1-2 cópias do transgene PhiYFP foram transferidas para a estufa e crescidas para ainda análises de expressão.

Tabela 5: Iniciadores e sondas para ensaios de número de cópias

Gene	Iniciador / Sonda	Sequência de Nucleotídeos	SEQ ID NO:
PhiYFP	iniciador dianteiro	CGTGTTGGAAAGAACCTGG	11
	iniciador reverso	CCGTGGTTGGCTTGGTCT	12
	sonda (Sequência/ marcador fluorescente)	5'FAM/CACTCCCCACTGCCT	13
Controle Zmlnv	Iniciador dianteiro	TGGCGGACGACGACTTGT	14
	Iniciador reverso	AAAGTTGGAGGCTGCCGT	15
	Sonda (sequência/ marcador fluorescente)	5'HEX/CGAGCAGACCGCCGTACTT	16
PAT	Iniciador dianteiro	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGA-GAGGT	17
	Iniciador reverso	CTTGATGCCTATGTGACACGTAAA-CAGT	18
	Sonda (sequência / rótulo fluorescente)	5'FAM/GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTACGCTGG	19

Tabela 6: Reagentes de reação PCR de número de cópias Taqman

reagente	concentração de trabalho	volume (microlitro)	concentração final
água	-	0,5	-
Roche LightCycler Master Mix	2X	5	1X
Iniciador dianteiro PhiYFP	10 µM	0,4	400 nM
Iniciador reverso PhiYFP	10 µM	0,4	400 nM
Sonda PhiYFP – marcada FAM	5 µM	0,4	200 nM
Iniciador dianteiro ZmInv	10 µM	0,4	400 nM
Iniciador reverso ZmInv	10 µM	0,4	400 nM
Sonda ZmInv – marcada com HEX	5 µM	0,4	200 nM
Polivinil pirrolidona (PVP)	10%	0,1	0,10%
Molde DNA genômico	~5 ng/µL	2	10 ng/µL

Tabela 7: condições de termociclagem para amplificação PCR de número de cópias

Etapa de PCR	Temperatura (°C)	Tempo	número de ciclos
1	95	10 minutos	1
2	95	10 segundos	40
	58	35 segundos	
	72	1 segundo	
3	40	10 segundos	1

Tabela 8: análise de número de cópias de transgene de plantas transgênicas

Construto	Eventos analisados	Simples (1-2 cópias)	complexo (> 2 cópias)
105748	21	15	6
105745	11	9	2

Exemplo 6: Quantificação ELISA de proteínas PhiYFP e PAT

[00194] Plantas foram amostradas em estágio V4-5 de desenvolvimento usando um ensaio ELISA de folha. Amostras foram coletadas em placas de tubos de coleta de 96 cavidades e 4 discos de folha (tamanho de punção de orifício de papel) foram tomados para cada amostra. Dois BBs de 4,5 mm (Daisy Corporation, Roger, AR) e 200 microlitros de tampão de extração [1x PBS suplementado com Tween-20 0,05% e BSA 0,05% (Millipore Probumin, EMD Millipore Corp., Billerica, MA)] foram adicionados a cada tubo. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 x g. O fluido superior (supernatante) foi removido e transferido para uma nova placa de tubos de coleta de 96 cavidades. A concentração de folha em cada tubo de amostra foi diluída 1:1000 com o tampão de extração. A diluição final da folha em cada tubo de amostra era de 1:100000. A diluição de 1:100000 é suficiente para detectar tanto o transgene quanto o gene endógeno (PAT).

ca, MA)] foram adicionados a cada tubo. Adicionais 200 microlitros de tampão de extração foram adicionados a cada tubo seguido por inversão para misturar. Placas foram giradas por 5 minutos em 3000 rpm. Sobrenadante foi transferido para correspondentes cavidades emplaca de 96 cavidades estocada sobre gelo. As placas Nunc 96-well Maxi-Sorp (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) foram usadas para ELISA. Placas foram revestidas com anticorpo de captura anti-YFP monoclonal de camundongo (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD). O anticorpo foi diluído em PBS (1 µg/mL) e 150 microlitros de PBS diluído foram adicionados por cavidade. As placas foram incubadas por toda noite a 4°C. As placas de toda a noite foram mantidas em temperatura ambiente por 20-30 minutos antes de lavagem 4x com 350 microlitros de tampão de lavagem [1x PBS suplementado com Tween-20 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)]. Placas foram bloqueadas com 200 microlitros por cavidade de tampão de bloqueio [1x PBS suplementado com Tween-20 0,05% plus BSA 0,5% (Millipore Probumin)] por um mínimo de 1 hora a +37°C seguido por 4x lavagem com 350 microlitros de tampão de lavagem (Tomtec QuadraWash 2, Tomtec, Inc., Hamden, CT).

[00195] Para ELISA YFP, Phi-YFP recombinante Evrogen 1 mg/mL (Axxora LLC, Farmingdale, NY) foi usado como um padrão. Uma curva-padrão de adaptação de 5-parâmetros (entre padrões de 12 ng/mL e 0,125 ng/mL) foi usada para assegurar que todos os dados caem na porção linear da curva. 100 microlitros de padrão ou amostra foram adicionados à cavidade. Uma diluição 1:4 mínima de amostra no Tampão de Ensaio foi usada. Placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente sobre agitador de placa (250 rpm; Titer Plate shaker) seguido por lavagem 4x com 350 microlitros de tampão de lavagem (Tomtec QuadraWash 2). Cerca de 100 microlitros de anticorpo primário anti-PhiYFP policlonal de coelho Evrogen 1 micrograma / mL

(Axxora) foi adicionado a cada cavidade. Placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente sobre um agitador de placa em 250 rpm seguido por lavagem 4x com 350 microlitros de tampão de lavagem (Tomtec QuadraWash 2). A seguir, 100 microlitros de anticorpo secundário HRP IgG anti-coelho (Thermo Scientific) diluído 1:5000 em tampão de Ensaio / Bloqueio, cujas proteínas PAT foram quantificadas usando kit de Envirologix (Portland, ME). As ELISAs foram realizadas usando múltiplas diluições de extratos de plantas e reagentes e instruções essencialmente como providos pelos fornecedores.

Exemplo 7: Expressão estável de planta de transgene ligado operavelmente a novos promotores

[00196] Expressão de proteína foi observada em tecidos de planta transgênica. Por exemplo, expressão de PhiYFP foi observada em calli de plantas T₀ que foram estavelmente transformadas através de co-cultivo com Agrobacterium. As plantas transgênicas foram crescidas de embriões de Z. mays transformados usando os construtos de vetor binário compreendendo o novo promotor, pDAB105745 (Z. mays c.v. B104, Figura 9) e o promotor controle, pDAB105748 (Z. mays c.v. B73, Figura 8). Os calli de plantas foram observados sob um microscópio estéreo (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) usando um filtro YFP e uma fonte de luz de 500 nm. Exemplos representativos da expressão estável de PhiYFP observada no tecido de callus das plantas de milho T₀ transgênicas compreendendo pDAB105745 como comparadas ao controle, pDAB105748, são mostrados na Figura 10. Os dados confirmam que o novo promotor compreendendo pDAB105745 (Z. mays c.v. B104), como aqui descrito, é capaz de dirigir robusta expressão do gene PhiYFP em tecido de callus de plantas transgênicas T₀.

[00197] Como descrito na Tabela 8, plantas inteiras que contiveram um baixo número de cópias (isto é, 1-2 cópias) do transgene PhiYFP foram crescidas em uma estufa. Em geral, cerca de cinco (5) a cerca

de dez (10) eventos por construto e cerca de cinco (5) plantas por evento foram usadas para análises de expressão T₁. Os dados de ELISA revelaram consistente expressão da proteína PhiYFP nas folhas de plantas de milho T₁ usando construtos vetores compreendendo o novo promotor pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), comparada ao construto controle, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73).

[00198] Uma expressão de proteína PhiYFP média de aproximadamente 347 ng/mg (+/- 22,9 ng/mg) de PhiYFP foi observada para as plantas T₁ compreendendo a nova construto promotora, pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104, Figura 9), comparado a aproximadamente 285,3 ng/mg (+/- 22,7 ng/mg) de proteína PhiYFP produzida pela planta controle compreendendo a construto controle, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, Figura 8). Estes resultados confirmam que o novo promotor de *Z. mays* c.v. B104, como aqui mostrado, foi útil na produção de características transgênicas em altos níveis de produção de proteína.

[00199] Em adição, a expressão de PAT média para todas as plantas T₁ compreendendo pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104) foi aproximadamente 93,7 ng/mg (+/- 7,4) como comparada a aproximadamente 105,8 ng/mg (+/- 7,4 ng/mg) de proteína PAT produzida pela planta controle compreendendo pDAB105748 do promotor *Z. mays* c.v. B73. No total, a expressão de proteína PAT para todas as plantas e milho foi显著mente menor que a expressão observada para o gene PhiYFP em plantas de milho.

[00200] Expressão de proteína PhiYFP também foi medida em pólen derivado dos pendões de plantas transgênicas T₁ selecionadas representando cada uma das novas construtos promotoras aqui descritas. Como mostrado na Figura 11, análises de imagens do pólen transgênico confirmam eu o novo promotor compreendendo pDAB105745 (*Z. mays* c.v. B104), como descrito neste pedido de patente, dirige expressão de proteína PhiYFP em pólen.

REIVINDICAÇÕES

1. Cassete de expressão de gene, caracterizado por compreender um promotor ligado operavelmente a um transgene, onde o promotor compreende um polinucleotídeo com pelo menos 90% de identidade de sequência para SEQ ID NO: 2.
2. Cassete de expressão de gene, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por promotor hibridizar sob condições rigorosas para uma sonda de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para um complemento de SEQ ID NO: 2.
3. Cassete de expressão de gene, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por transgene ligado operavelmente codificar um polipeptídeo ou RNA pequeno.
4. Cassete de expressão de gene, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por transgene ser selecionado do grupo consistindo em um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação de DNA, e um transgene marcador selecionável.
5. Cassete de expressão de transgene, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ainda compreender uma região 3'-não não traduzida.
6. Vtor recombinante, caracterizado por compreender o cassete de expressão de gene como definido na reivindicação 1.
7. Vtor recombinante, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por vtor ser selecionado do grupo consistindo em um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma artificial bacteriano, um vírus, e um bacteriófago.
8. Célula transgênica, caracterizada por compreender o

cassete de expressão de gene como definido na reivindicação 1.

9. Célula transgênica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por célula transgênica ser uma célula de planta transgênica.

10. Planta transgênica, caracterizada por compreender a célula de planta transgênica como definida na reivindicação 9.

11. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por planta transgênica ser uma planta monocotiledônea ou dicotiledônea.

12. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada por planta monocotiledônea ser selecionada do grupo consistindo em uma planta de milho, uma planta de arroz, e uma planta de trigo.

13. Semente transgênica, caracterizada por ser da planta transgênica como definida na reivindicação 10.

14. Célula transgênica, caracterizada por compreender um polinucleotídeo sintético com pelo menos 90% de identidade de sequência a SEQ ID NO: 2.

15. Célula transgênica, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por polinucleotídeo sintético hibridizar sob condições rigorosas para uma sonda de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para um complemento de SEQ ID NO: 2.

16. Célula transgênica, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por célula transgênica ser uma célula de planta transgênica.

17. Célula transgênica, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada por célula de planta transgênica ser produzida através de um método de transformação de planta.

18. Célula transgênica, de acordo com a reivindicação 17,

caracterizada por método de transformação de planta ser selecionado do grupo consistindo em um método de transformação mediado por Agrobacterium, um método de transformação biolística, um método de transformação com carbeto de silício, um método de transformação com protoplasto, e um método de transformação com lipossoma.

19. Planta transgênica, caracterizada por compreender a célula de planta transgênica como definida na reivindicação 14.

20. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada por planta transgênica ser uma planta monocotiledônea.

21. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada por planta monocotiledônea ser selecionada do grupo consistindo em uma planta de milho, uma planta de arroz, e uma planta de trigo.

22. Semente transgênica, caracterizada por ser da planta transgênica como definida na reivindicação 21.

23. Vetor recombinante, caracterizado por compreender o cassete de expressão de gene como definido na reivindicação 14.

24. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por vetor ser selecionado do grupo consistindo em um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma artificial bacteriano, um vírus e um bacteriófago.

25. Método para expressão de uma sequência codificante heteróloga em uma planta transgênica, o método caracterizado por compreender:

a) transformação de uma célula de planta com um cassete de expressão de gene compreendendo uma sequência de polinucleotídeos compreendendo SEQ ID NO: 2 ligada operavelmente à sequência codificante heteróloga, que está operavelmente ligada a uma região 3'-não traduzida;

b) isolamento de célula de planta transformada compre-

endendo o cassete de expressão de gene;

c) regeneração de célula de planta transformada em uma planta transgênica; e,

d) obtenção de planta transgênica, onde a planta transgênica compreende o cassete de expressão de gene compreendendo a sequência de polinucleotídeos compreendendo SEQ ID NO: 2.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por sequência codificante heteróloga ser selecionada do grupo consistindo em uma sequência codificando resistência a inseticida, sequência codificando tolerância a herbicida, uma sequência codificando eficiência de uso de nitrogênio, uma sequência codificando eficiência de uso de água, uma sequência codificando qualidade nutricional, uma sequência codificando ligação a DNA, e uma sequência codificando marcador selecionável.

27. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por transformação de uma célula de planta ser um método de transformação de planta.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por método de transformação de planta ser selecionado do grupo consistindo em um método de transformação mediado por Agrobacterium, um método de transformação biológico, um método de transformação com carbeto de silício, um método de transformação com protoplasto, e um método de transformação de lipossoma.

29. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por planta transgênica ser uma planta transgênica monocotiledônea ou dicotiledônea.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por planta transgênica monocotiledônea ser selecionada do grupo consistindo em uma planta de milho, uma planta trigo, e uma planta de arroz.

31. Semente transgênica, caracterizada por ser da planta transgênica como definida na reivindicação 25.

32. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por sequência codificante heteróloga ser expressa em um tecido de planta transgênica.

33. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por tecido de planta transgênica ser uma raiz, broto, caule, ou pólen de planta transgênica.

34. Método para isolamento de uma sequência de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para SEQ ID NO: 2, o método caracterizado por compreender:

a) identificação de sequência de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para SEQ ID;

b) produção de uma pluralidade de sequências iniciador de oligonucleotídeos, onde as sequências iniciador de oligonucleotídeos se ligam à sequência de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para SEQ ID;

c) amplificação de sequência de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para SEQ ID a partir de uma amostra de DNA com sequências de iniciadores de oligonucleotídeos selecionadas da pluralidade de sequências de iniciadores de oligonucleotídeos; e,

d) isolamento de sequência de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para SEQ ID.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado por sequência de polinucleotídeos isolada compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para SEQ ID NO: 2 estar

operavelmente ligada a um transgene.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado por transgene operavelmente ligado codificar um polipeptídeo ou um RNA pequeno.

37. Sequência de polinucleotídeos purificada, caracterizada por compreender pelo menos 90% de identidade de sequência para SEQ ID NO: 2, onde a sequência de polinucleotídeos purificada promove expressão de um transgene.

38. Sequência de polinucleotídeos purificada, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada por uma sequência de sonda de polinucleotídeos compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% para o complemento de SEQ ID NO: 2 hibridizar sob condições rigorosas para a sequência de polinucleotídeos purificada de acordo com a reivindicação 37.

39. Sequência de polinucleotídeos purificada, de acordo com a reivindicação 37, caracterizada por sequência de polinucleotídeos purificada estar operavelmente ligada a um transgene.

40. Transgene ligado operavelmente, como definido na reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o transgene ligado operavelmente codifica um polipeptídeo.

41. Cassete de expressão de gene, caracterizado por compreender a sequência de polinucleotídeos purificada ligada operavelmente ao transgene como definido da reivindicação 37, que está ligado operavelmente a uma região 3'-não traduzida.

42. Cassete de expressão de gene, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por transgene ser selecionado do grupo consistindo em transgene de resistência a inseticida, transgene de tolerância a herbicida, transgene de eficiência de uso de nitrogênio, transgene de eficiência de uso de água, transgene de qualidade nutricional, transgene de ligação de DNA, e transgene marcador selecioná-

vel.

43. Vetor recombinante, caracterizado por compreender o cassete de expressão de gene como definido na reivindicação 41.

44. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado por vetor ser selecionado do grupo consistindo em um vetor plasmídeo, um vetor cosmídeo, e um vetor BAC.

45. Célula transgênica, caracterizada por compreender a sequência de polinucleotídeos purificada como definida na reivindicação 37.

46. Célula transgênica, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada por células transgênicas serem células de planta transgênica.

47. Planta transgênica, caracterizada por compreender a célula de planta transgênica como definida na reivindicação 46.

48. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 47, caracterizada por planta transgênica ser uma planta monocotiledônea.

49. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 48, caracterizada por planta monocotiledônea ser selecionada do grupo consistindo em uma planta de milho, uma planta de trigo, e uma planta de arroz.

50. Semente transgênica, caracterizada por ser da planta transgênica como definida na reivindicação 49.

FIG. 1

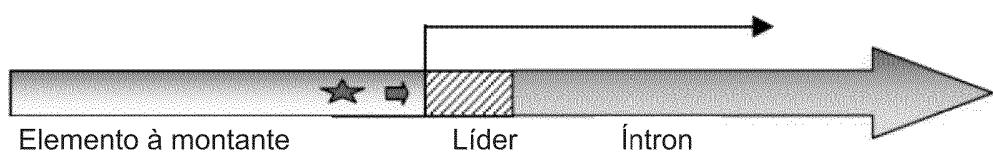


FIG. 2

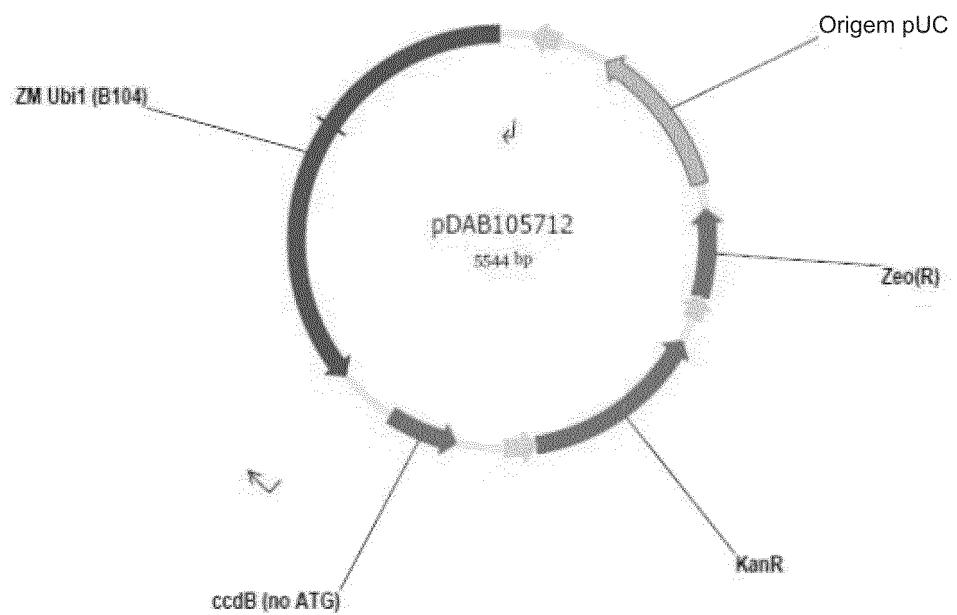


FIG. 3

FIG. 4

FIG. 5

Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(1)	1	-----CCCCGGTUCGTGCCCTCTCT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(1)	31	GTGCAGCGTGACCCGGTUCGTGCCCTCTCT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(20)	60	31-----AGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAAGTA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(31)	60	AGAGATAAATGAGCATTGCATGTCTAAAGTTA
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(50)	90	61-----TAAAAAAATTACACACATATTTTTTT-GTCAC
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(61)	90	TAAAAAAATTACACACATATTTTTTTGTCAC
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(79)	120	91-----ACTTATTTGAAGTCTAGTTTATCTATCTCT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(91)	120	ACTTGTGGTGAAGTGCAGTTTATCTATCTCT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(109)	150	121-----ATACATATATTTAAACTTCACTCTACAAAT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(121)	150	ATACATATATTTAAACTTCACTCTACAAAT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(139)	180	151-----ATATATAGTCTATAATACTAAAAATAATTAA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(151)	180	ATATAATCTATAGTACTACAAATAATTCA
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(169)	210	181-----GTGTTTAGAGGATCATATAAAAACCTCC
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(181)	210	GTGTTTAGAGAATCATATAAAATGAACAGT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(199)	240	211-----TAGACATGGTCTAAAGGATAATTGAATATT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(211)	240	TAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(229)	270	241-----TTGACAA-----TCTACAGTTTATCTTT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(241)	270	TTGACAAACAGGACTCTACAGTTTATCTTT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(253)	300	271-----TTAGTGTGCATGTGATCTCTCTGTTTTTT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(271)	300	TTAGTGTGCATGTGTTCTC-CT-TTTTTTT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(283)	330	301-----TGCAAATAGCTTGACCTATATAATACTTCA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(299)	330	TGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCA
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(313)	360	331-----TCCATTTATAGTACATCCATTTAGGATT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(329)	360	TCCATTTATAGTACATCCATTTAGGTT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(343)	390	361-----TAGGGTTGATGGTTCTATAGACTAATT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(359)	390	TAGGGTTAATGGTTTTATAGACTAATT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(373)	420	391-----T--ACTACATCCATTTTATTCT-TTTTACT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(389)	420	TTTACTACATCTATTCTATTCTATTCTATTAGC
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(400)	450	421-----CTCTAATTTTTTAAAACAAAAACTCTATT
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(419)	450	CTCTAAATTAAAG-AAAACAAAAACTCTATT
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(430)	480	451-----TAGTTTTTTT-ATTTAATAATTAGATATA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(448)	480	TAGTTTTTTTATTTAATAGTTAGATATA
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(459)	510	481-----AATGAAATAAAAATAATTGACTACATA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(478)	510	AATAGAAATAAAAATAAAGTGACTIONATA
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(489)	540	511-----AACAAATACCCCTTAAAGAAAT-AAAAAA
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(508)	540	AAACAAATACCCCTTAAAGAAATTTAAACAAA

FIG. 5 cont.

		541	570
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(518)	CTAACGAAACATTTCCTTGTTCGAGTAG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(538)	CTAAGGAAACATTTCCTTGTTCGACTAG	
		571	600
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(548)	ATAATGACAGGCTGTTAACGCCGTCGACG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(568)	ATAATGCCAGCCTGTTAACGCCGTCGACG	
		601	630
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(578)	AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCCAGC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(598)	AGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCCAGC	
		631	660
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(608)	AGCGTCGGCTGGGCAAGCGAACCGAGACG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(628)	AGCGTCGGCTGGGCAAGCGAACCGAGACG	
		661	690
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(638)	GCACGGCATCTCTGTAGCTGCCCTGGACC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(658)	GCACGGCATCTCTGTGCGCTGCCCTGGACC	
		691	720
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(668)	CCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGAC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(688)	CCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGAC	
		721	750
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(698)	TTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGGCG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(718)	TTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGGCG	
		751	780
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(728)	TGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCACGG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(748)	TGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGCGGCACGG	
		781	810
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(758)	CAGGCGGCCCTTCCCTCCTCACGGCACCC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(778)	CAGGCGGCCCTCCTCCTCACGGCACCC	
		811	840
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(788)	GGCAGCTACGGGGGATTCCTTCCCACCGCC	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(808)	GGCAGCTACGGGGGATTCCTTCCCACCGCC	
		841	870
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(818)	TCCCTCGCTTCCCTCCTCGCCCCGCCGTA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(838)	TCCCTCGCTTCCCTCCTCGCCCCGCCGTA	
		871	899
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 montante	(848)	ATAAAATAGACACCCCTCCACACCCCTCTT	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 montante	(868)	ATAAAATAGACACCCCTCCACACCCCTCTT	

FIG. 6

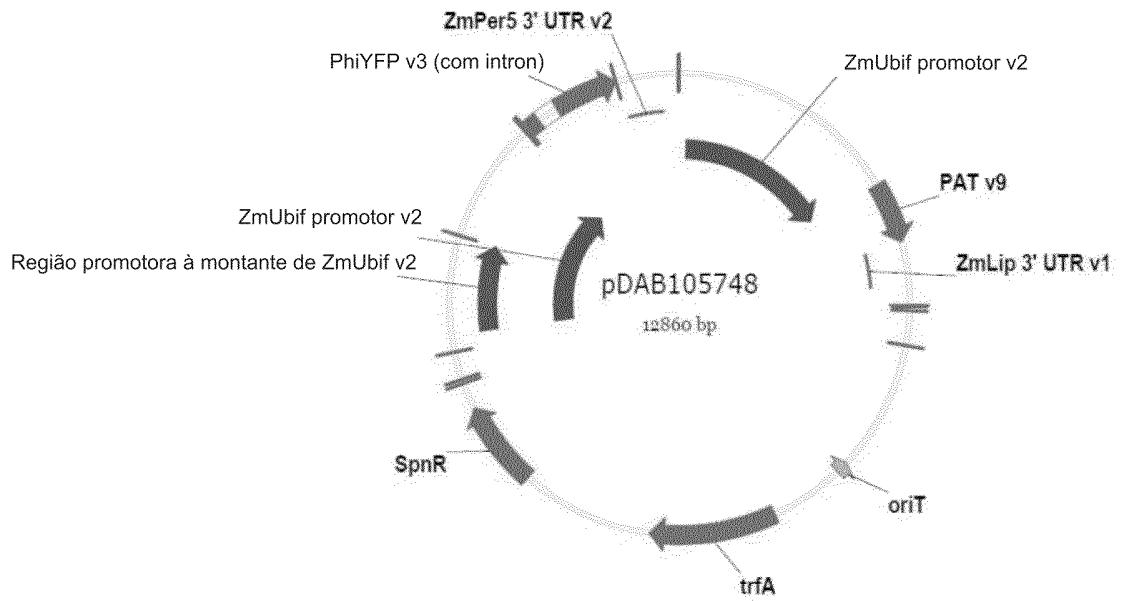
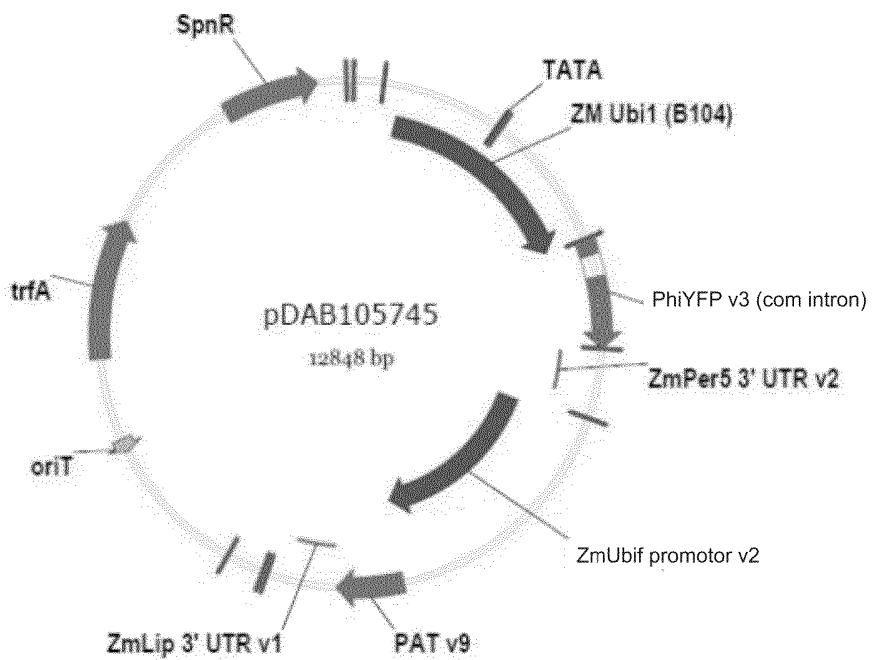
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 líder	(1)	1	30
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 líder	(1)	TCCCCAACCTCGTGTTCGTTGGAGCGCAC	
		TCCCCAACCTCGTGTTCGTTGGAGCGCAC	
		31	60
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 líder	(31)	ACACACGCAACCCAGATCTCCCCAAATCCA	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 líder	(30)	ACACACACAACCCAGATCTCCCCAAATCCA	
		61	83
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 líder	(61)	GCCGTGGCACCTCCGCTTCAAG	
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 líder	(60)	CCCGTGGCACCTCCGCTTCAAG	

FIG. 7

1 30
 (1) GTRGCCGGCTCGTCTCTCCCCCCCCCCCCC
 (1) GTRGCCGGCTCGTCTCTCCCCCCCCCCCC
 31 60
 (31) CTCCTCTACCTTCTCTAGATCGG-GTTCGGG
 (29) -TCCTCTACCTTCTCTAGATCGG-GATCGG
 61 90
 (61) TGCATGGCATGGTTAGGGGGCGCTGAGTCTTA
 (58) TGCATGGCATGGTTAGGGGGCGCTGAGTCTTA
 91 120
 (91) CTTCTGTTCATGTTGTGTTAGATC
 (84) CTTCTGTTCATGTTGTGTTAGATCAGCAACA
 121 150
 116) -----CGCTTCTGCTTACATCCCT
 114) TGTTCATGTTCATGTTGTGAT-GATGTTG
 151 180
 136) GCGCTAG--CGTTCTGTAACACGGATGCCAC
 143) TGCCTTGGGGGCGCTTCTAG-TCGGGAG
 181 210
 164) CT---TAC-GTCAGACAACTGTTCTGATTCCT
 172) TAGATACTGTTCAAGATACCTGGGAA
 211 240
 191) AACCTGCCAGTGTCTTCTTCTTGGGAATCG
 202) TTATTAATTTCGATCTGGAATCTTGTGCG
 241 270
 221) TGGGATGGCTCAUC--CTTCCGGACACCG
 232) ATACATCTCATAGTTAACGAGTTAACATG
 271 300
 249) --GGATCGATTTCATGATTTTTTCTTCTT
 262) ATGCGAAGAAATATCTCATCTAGGATAGCTA
 301 330
 275) TC---CTTGCATAGGGTTGGT
 292) TACATGTCATGCGGGTTTACTGATGCA
 331 360
 295) -----TCCTCTTCCTTAACTTC
 322) ATACAGAGATGCTTCTTCTTCGCTTGGTT
 361 390
 316) TATATCCCGTSCACTTCTTCTCGGCTTC
 352) GTGTGATATGGTCTGGTCTGGGGGGCTGCT
 391 420
 346) CTTTCATCTTTTCTTGCTTGGTTGTC
 382) CTAGATCGGAGTAGAAATACCTGTTCAA
 421 450
 376) ATGATCTGCTCTGGTCTGGGGCGCTGCT
 412) ACCTGCTGATCTTAAAGGGCTGCT
 451 480
 406) GATGGAGTAGAATTCTGTTCTAACCTAC
 442) CTCTGAGTAGAATTCTGTTCTAACCTAC
 481 510
 436) TCTGAGTAGAATTCTGTTCTAACCTAC
 472) TGGGGCTTAACTAAA---GATCTGATG
 511 540
 466) TGCTGCTCCATTCATATTCATAGTTACGAT
 499) TACATGCG-TACATCTTCATAGTTACGAGT

FIG. 7 cont.

Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(496)	541	570
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(528)	TGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAG	
		TTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAG	
		571	600
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(526)	GATAGGTATAACATGTTGATGCCGGTTTAC	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(558)	GATAGGTATAACATGTTGATGCCGGTTTAC	
		601	630
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(556)	TGATGCATATAACAGAGATGCCCTTTGTCG	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(588)	TGATGCATATAACAGAGATGCCCTTTGTCG	
		631	660
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(586)	CTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTGGGC	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(617)	CTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTGGGC	
		661	690
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(616)	GGTCGTTCAATTGTTCTAGATCGGAGTAGA	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(647)	GGT-----CGTTCTAGATCGGAGTAGA	
		691	720
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(646)	ATACTGTTCAAACCTACCTGGTGTATTAT	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(669)	ATACTGTTCAAACCTACCTGGTGGATTAT	
		721	750
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(676)	TAATTTGGAACTGTATGTGTGTGTATAC	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(699)	TAATTTGTATCTTATGTGTGCCATAC	
		751	780
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(706)	ATCTTCATAGTTACGAGTTAACATG-----G	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(729)	ATCTTCATAGTTACGAGTTAACATGATGG	
		781	810
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(733)	ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACA	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(759)	ATGGAAATATTGATCTAGGATAGGTATACA	
		811	840
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(763)	TGTTGATGTGGGTTTACTGATGCATATAC	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(789)	TGTTGATGTGGGTTTACTGATGCATATAC	
		841	870
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(793)	ATGATGGCATATGCAGCAGTCTATTATATG	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(819)	ATGATGGCATATGCCAGCAGTCTATTATATG	
		871	900
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(823)	CTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAAT	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(849)	CTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAAT	
		901	930
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(853)	AAACAAGTATGTTTATAATTATTTGATGC	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(879)	AAACAAGTATGTTTATAATTATTTGATGC	
		931	960
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(883)	TTGATATACTTGGATGATGCCATATGCAGC	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(909)	TTGATATACTTGGATGATGCCATATGCAGC	
		961	990
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(913)	AGCTATATGTGGATTTTTAGCCCTGCCT	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(939)	AGCTATATGTGGATTTTTAGCCCTGCCT	
		991	1020
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(943)	TCATACGCTATTTATTGCTTGGTACTGTT	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(968)	TCATACGCTATTTATTGCTTGGTACTGTT	
		1021	1050
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(973)	TCTTTGTC-GATGCTCACCCGTTGTTG	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(998)	TCTTTGTCGATGCTCACCCGTTGTTG	
		1051	1065
Zea mays c.v. B73 Ubi-1 intron	(1002)	GTGTTACTCTGCA-	
Zea mays c.v. B104 Ubi-1 Intron	(1028)	GTGTTACTCTGCA-G	

FIG. 8**FIG. 9**

10/10

FIG. 10

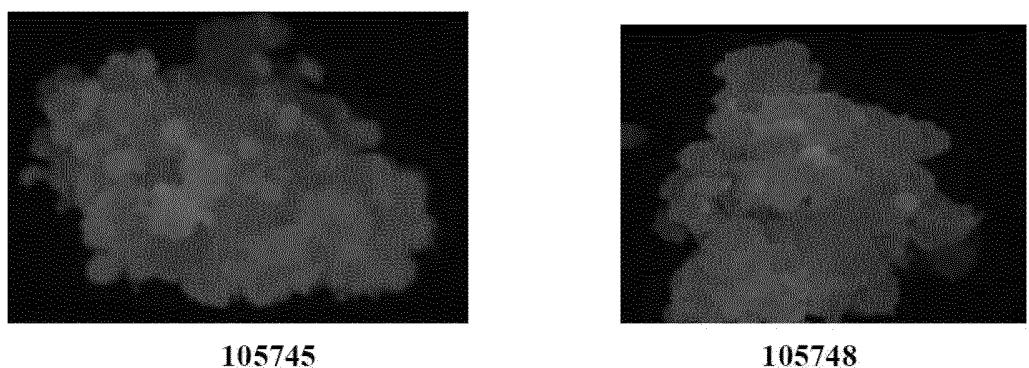
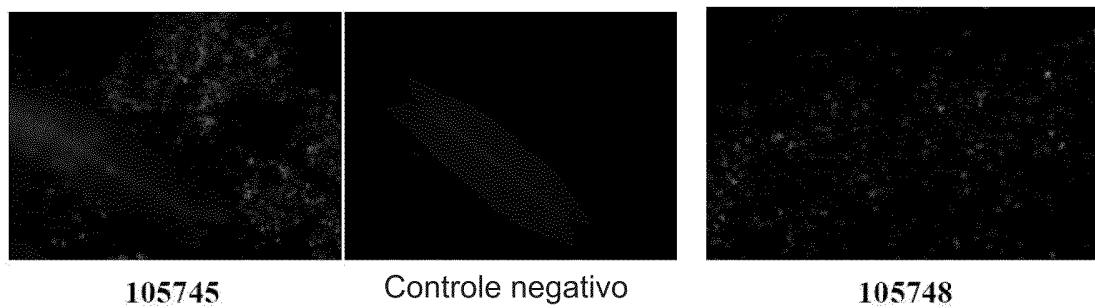


FIG. 11



RESUMO

Patente de Invenção: "**PROMOTORES UBIQUITINA DE MILHO**".

A presente invenção refere-se ao promotor Ubiquitina de *Zea mays* c.v. B73 (*Z. mays* c.v. B73 Ubi-1), que dirige altos níveis de expressão constitutiva de transgene em plantas. Uso repetido do mesmo promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 em construtos multi – genes também pode conduzir ao silenciamento de gene, pelo qual torna produtos transgênicos menos eficazes. São providos elementos promotores reguladores de gene, construtos, e métodos para expressão de um transgene em células de plantas e/ou tecidos de plantas usando elementos reguladores de gene a partir do promotor Ubi-1 de um diferente genótipo de *Z. mays*, *Z. mays* c.v. B104.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



3ED1A91E82FB34AB

Campo 2



AEFA5B69EBECE2BA

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P210803 - LISTAGEM DE SEQUÊNCIA.txt
- Data de Geração do Código: 30-12-2014
- Hora de Geração do Código: 10:18:14
- Código de Controle:
 - Campo 1: 3ED1A91E82FB34AB
 - Campo 2: AEFA5B69EBECE2BA