



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

(21) **PI0609216-0 A2**

(22) Data de Depósito: 21/03/2006
(43) Data da Publicação: 02/03/2010
(RPI 2043)



(51) *Int.Cl.:*
A01H 1/00 (2010.01)
C12N 15/82 (2010.01)

(54) Título: **MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA VETOR, MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL, E PREFERENCIALMENTE EM UMA RAIZ VEGETAL E MÉTODO PARA EXPRESSAR DE MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM UMA RAIZ VEGETAL**

(30) Prioridade Unionista: 21/03/2005 US 60/663,815

(73) Titular(es): PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

(72) Inventor(es): Guihua Lu, Xu Hu

(74) Procurador(es): Claudia Christina Schulz

(86) Pedido Internacional: PCT US2006010273 de 21/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/102343de 28/09/2006

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL E PREFERENCIALMENTE EM UMA RAIZ VEGETAL E MÉTODO PARA EXPRESSAR DE MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM UMA RAIZ VEGETAL A presente invenção provê composições e métodos para regular a expressão de sequências heterólogas de nucleotídeos em plantas. As composições incluem uma nova sequência de nucleotídeos para um promotor induzido e raiz-preferencial para o gene que codifica uma proteína dirigente e soja. É fornecido um método para expressar uma sequência heteróloga de nucleotídeos em uma planta usando as sequências promotoras aqui divulgadas. O método compreende incorporar, estavelmente em um genoma, uma sequência nucleotídica operacionamente ligada ao promotor raiz-preferencial da presente invenção e regenerar uma planta estavelmente transformada capaz de expressar a sequência de nucleotídeos.

```
actatatttg  ttctttatct  atattcagca  aaaaaagca  atgtttgtag  ttatttataa  60
gacatagtta  ataaattttt  ttatccctta  ttataaaatt  ttattttatc  ttctttgtgc  120
attaattatt  ttgaataaaa  taactttgaat  tatctctttt  ttccctaaaa  agatcgaaga  180
agatgagtat  ttcaataaaa  gttgaagata  tatttcaaaa  agtattataa  atttaatacc  240
aataattaaa  ttaatttaatt  ttcttaatta  ataaacataa  attaatcaat  tataatttat  300
aattaggaat  aaaaaaatat  ttatctattt  ttcaaccatc  attaatcaat  cogtaattcc  360
ataattataa  gtaattgaatt  aatagugaat  aagaatgttt  taataaaatt  atttcaataa  420
ataatttatt  tattattatt  tttaattatg  gtaaaaaatc  ttaaatatca  atcattttga  480
aatggggaaa  tgggggagta  catgttagat  ttgtaatcaa  ttgttaaat  acaactttca  540
tttttgggta  gttgaagtcca  ttggaataa  aaattatact  tttaattatg  attttatacc  600
caaatcgaaa  atgggaactca  aacctttaag  tagcccataa  gccaaattag  atgtgttgac  660
tatttggggt  acattgcccc  ttttcaaaga  catgtgtttt  aacgtttgac  ctcaaatgac  720
ccacatgcgt  atgctgcagt  aaataatc  caaaagttga  atggtcaata  atttggctg  780
tttggaagt  gttatctgtc  aagaaaaata  ataataagg  atcatctcag  ccatgcaact  840
ggatgaagcg  gaagataatc  agtaaaagcta  tatcttggac  tcacaattaa  ttaattcaat  900
tttaaatcca  acctacgcgg  acgaacgtct  aggaatcaat  tgttgcgtgt  ttttagcaca  960
tgcatataca  ataattaata  tgaggttgtt  tcaaacatca  aagactttca  aatctcaact  1020
ttctTATAAA  tagtgcctca  tcttctcatg  gagtagatca  actaactcag  tatatactca  1080
ctaattggac  aacctctctc  ctactctc  1108
```

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM PLANTA E EM CÉLULA VEGETAL, MÉTODO PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
5 PREFERENCIALMENTE EM RAIZ VEGETAL, MÉTODO PARA EXPRESSAR DE MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM RAIZ VEGETAL

10 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é relacionada ao campo da biologia molecular, mais particularmente a regulação de expressão gênica em plantas.

15 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Avanços recentes em engenharia genética vegetal permitiram a construção de plantas apresentando
20 características ou traços melhorados, tais como resistência a doenças, resistência a insetos, resistência a herbicidas, estabilidade ou tempo de validade ampliados do produto final ao consumidor obtido a partir das plantas, e melhoria da qualidade nutricional das partes comestíveis da planta.
25 Logo, um ou mais genes desejados de uma fonte diferente do que a planta, mas construídos para conferir características ou qualidades diferentes ou melhoradas, podem ser incorporados ao genoma da planta. Novos genes podem ser expressos na célula vegetal para exibir o fenótipo desejado
30 tal como uma nova qualidade ou característica.

Os sinais regulatórios característicos devem estar presentes e estar na posição adequada em relação ao gene, de modo a obter a expressão do gene recentemente inserido na
5 célula vegetal. Estes sinais regulatórios podem incluir uma região promotora, uma sequência líder 5' não traduzida e uma sequência 3' de poliadenilação/terminação da transcrição.

Um promotor é uma sequência de DNA que conduz a
10 maquinaria celular de uma planta para produzir RNA a partir de uma sequência codificante contígua a jusante (3') do promotor. A região promotora influencia a taxa, o estágio de desenvolvimento e o tipo celular no qual o transcrito de RNA do gene é produzido. O transcrito de RNA é processado
15 para produzir o RNA mensageiro (mRNA) que serve como um molde para a tradução da sequência de RNA em uma sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. A sequência líder 5' não traduzida é uma região do mRNA a montante da região codificante da proteína, que pode desempenhar um
20 papel na iniciação e na tradução do mRNA. O sinal 3' de poliadenilação/ terminação da transcrição é uma região não traduzida abaixo da região codificante da proteína, que proporciona em células vegetais a terminação do transcrito de RNA e a adição de nucleotídeos poliadenilatos à ponta 3'
25 do RNA.

A expressão de sequências heterólogas de DNA em uma planta hospedeira é dependente da presença de um promotor operacionalmente ligado que é funcional dentro de uma célula
30 hospedeira. O tipo da sequência promotora escolhida é

baseado em quando e aonde dentro do organismo a expressão de
seqüência heteróloga é desejada. Onde a expressão em
tecidos ou órgãos específicos é desejada, promotores tecido-
preferenciais podem ser usados. Onde a expressão gênica em
5 resposta a um estímulo é desejada, promotores induzíveis são
os elementos regulatórios a escolher. Por outro lado, onde
é desejada a expressão contínua em todas as células de uma
planta, promotores constitutivos são utilizados.

10 Um promotor induzível é um promotor que é capaz de
ativar direta ou indiretamente a transcrição de uma ou mais
seqüências de DNA ou genes em resposta a um indutor. Na
ausência de um indutor, as seqüências de DNA ou genes não
serão transcritos ou serão transcritos em um nível abaixo de
15 um estado induzido. O indutor pode ser um agente químico,
tal como um metabólito, regulador de crescimento, herbicida
ou composto fenólico, ou um estresse fisiológico diretamente
imposto à planta como frio, calor, sal, seca, ou toxinas.
No caso do combate a pragas em vegetais, também é desejável
20 ter um promotor que é induzido por patógenos de plantas,
incluindo pragas de insetos em plantas, nematódeos, ou
agentes de doença como uma bactéria, vírus ou fungo. O
contato com o patógeno vai induzir a ativação da
transcrição, tal que uma proteína de combate a patógeno será
25 produzida no momento em que será efetiva em defender a
planta. Um promotor induzido por patógeno pode também ser
usado para detectar a presença de um patógeno, por exemplo,
pela expressão de um marcador detectável, de maneira que a
necessidade de aplicação de pesticidas pode ser estimada.
30 Uma célula vegetal contendo um promotor induzível pode ser

exposta a um indutor ao aplicar-se externamente o indutor na célula ou planta, por exemplo, pulverizando, regando, aquecendo, ou pela exposição do agente patogênico.

5 Um promotor constitutivo é um promotor de conduz a expressão de um gene pelas variadas partes de uma planta e continuamente por todo o desenvolvimento da planta. Exemplos de alguns promotores constitutivos que são amplamente usados para induzir a expressão de genes
10 heterólogos em plantas transgênicas incluem o promotor do gene da nopalina sintase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* (U.S. Patent No. 5.034.322), os promotores 35S e 19S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), aqueles derivados de qualquer dos muitos genes de actina, que são conhecidos por
15 serem expressos na maioria dos tipos celulares (U.S. Patent No. 6.002.068), e o promotor da ubiquitina, que é um produto gênico conhecido por se acumular em muitos tipos celulares.

Seqüências regulatórias adicionais a montante e/ou a
20 jusante da seqüência principal do promotor podem ser incluídas em construções de expressão de vetores de transformação para ocasionar níveis variáveis de expressão de seqüências heterólogas de nucleotídeos em uma planta transgênica. Alterar plantas geneticamente através do uso
25 de técnicas de engenharia genética para produzir plantas com características úteis requer, conseqüentemente, a disponibilidade de uma variedade de promotores.

Com o objetivo de maximizar a aplicação comercial da
30 tecnologia de plantas transgênicas, é importante conduzir a

expressão do DNA introduzido de uma maneira sítio específica. Por exemplo, é desejável produzir compostos tóxicos de defesa em tecidos sujeitos ao ataque de patógenos, mas não em tecidos que servem para ser colhidos ou comidos por consumidores. Através do direcionamento localizado da síntese ou estocagem de proteínas ou compostos desejáveis, as plantas podem ser manipuladas como fábricas, ou sistemas de produção, para uma tremenda variedade de compostos com utilidade comercial. Promotores célula-específicos oferecem a habilidade de dirigir a síntese de compostos, espacialmente e temporalmente, para tecidos ou órgãos altamente especializados, tais como raízes, folhas, tecidos vasculares, embriões, sementes, ou flores.

Alternativamente, pode ser desejável inibir a expressão de uma seqüência de DNA nativa dentro de tecidos de uma planta para conseguir o fenótipo desejado. Tal inibição poderia ser atingida com a transformação da planta de forma a conter um promotor tecido-específico operacionalmente ligado a uma seqüência nucleotídica anti-senso, tal que a expressão da seqüência anti-senso produza um transcrito de RNA que interfere com a tradução do mRNA da seqüência nativa de DNA.

De particular interesse são promotores que são induzidos por patógenos de plantas. Infecção por patógeno, como infecção por nematódeo, é um problema significativo no cultivo de plantas de importância na agricultura. Por exemplo, o nematódeo do cisto da soja (*Heterodera glycines*, aqui referido como "SCN") é uma praga comum que causa

danos todos os anos a soja. Tal dano é o resultado da atrofia da planta de soja, causada pelo cisto do nematódeo. As plantas atrofiadas apresentam sistemas radiculares menores, apresentam sintomas de deficiência de
5 minerais em suas folhas, e definham facilmente. Acredita-se que o cisto do nematódeo de soja seja responsável por perdas estimadas superiores a 1 bilhão de dólares por ano na produção de soja na América do Norte. Outros nematódeos patogênicos de importância na agricultura
10 incluem os cistos de nematódeo de batata *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*, que são pragas-chave de batata, enquanto que o cisto de nematódeo de beterraba *Heterodera schachtii* é o problema principal para os plantadores beterraba na Europa e nos Estados Unidos.

15

O método básico de controle de nematódeos tem sido através da aplicação de compostos químicos altamente tóxicos. O uso comum de compostos químicos provoca muitos problemas relacionados ao meio-ambiente por causa da não
20 seletividade dos compostos e do desenvolvimento de resistência aos agentes químicos por parte dos insetos. Nematicidas como o Aldicarb ("chumbinho") e seus produtos derivados são conhecidos por serem altamente tóxicos aos mamíferos. Como resultado, restrições governamentais
25 foram impostas à utilização destes agentes químicos. O nematicida mais amplamente utilizado, o brometo de metila, logo será retirado do mercado, e até o presente, não há candidato promissor para substituir este tratamento. Assim, há uma grande necessidade por composições e métodos
30 não químicos, efetivos, para o controle de nematódeos.

Várias abordagens para controle de praga foram tentadas incluindo o uso de organismos biológicos que são, tipicamente, "predadores naturais" das espécies alvo a serem controladas. Tais predadores podem incluir outros insetos, fungos, e bactérias tais como *Bacillus thuringiensis*. Em contra partida, grandes colônias de pragas de insetos foram criadas em cativeiro, esterilizadas e lançadas no ambiente na esperança de que o encontro entre insetos esterilizados e insetos selvagens férteis reduziria a população de insetos. Apesar de estas abordagens terem apresentado algum sucesso, elas implicam em uma despesa considerável e apresentam várias dificuldades importantes. Por exemplo, é difícil tanto aplicar organismos biológicos em grandes áreas quanto fazer com que tais organismos vivos permaneçam na área tratada ou nas espécies de plantas tratadas por um tempo prolongado. Insetos predadores podem migrar e fungos e bactérias podem ser lavados de uma planta ou removidos, pela chuva, de uma área tratada. Conseqüentemente, apesar de o uso de tais controles biológicos apresentarem características desejáveis e terem atingido algum sucesso, estes métodos, na prática, não alcançaram o objetivo de controlar o dano causado por nematódeos em plantas.

25

Avanços em biotecnologia têm apresentado novas oportunidades para o controle de pragas por meio da engenharia genética. Em particular, avanços em genética de plantas juntamente com a identificação de fatores de crescimento dos insetos e agentes ou compostos de defesa

30

vegetal naturalmente existentes oferecem a oportunidade de criar plantas cultiváveis transgênicas capazes de produzir tais agentes de defesa e, através estes, proteger as plantas contra o ataque de insetos e a doença vegetal resultante.

Obstáculos adicionais ao controle de pragas são impostos por certas pragas. Por exemplo, é conhecido que certos nematódeos, como o cisto de nematódeo de soja ("SCN"), podem inibir alguma expressão gênica em plantas no sítio de alimentação do nematódeo (ver Gheysen and Fenoll (2002) *Annu Rev Phytopathol* 40:191-219). Logo, ao implementar uma abordagem transgênica para o controle de pragas, um fator importante é aumentar a expressão de genes desejados em resposta ao ataque de patógeno. Conseqüentemente, há uma necessidade continuada para a expressão controlada de genes deletérios para pragas em resposta ao dano na planta.

Um método promissor para o controle de nematódeos é a produção de plantas transgênicas que são resistentes a infecção de nematódeos e reprodução dos mesmos. Por exemplo, com o uso de promotores induzidos por nematódeos, plantas podem ser alteradas para expressar proteínas nematicidas em resposta a exposição a nematódeos. Ver por exemplo, U.S. Patent No. 6.252.138, aqui incorporado como referência. Por outro lado, alguns métodos usam uma combinação de ambos promotores nematódeo-induzidos e nematódeo-reprimidos para obter resistência a nematódeos. Logo, WO 92/21757, aqui incorporado por referência, discute

o uso de um sistema de dois promotores para romper locais de alimentação de nematódeos, aonde um promotor induzido por nematódeo conduz a expressão de um produto tóxico que mata as células vegetais no local de alimentação, enquanto
5 que o outro promotor nematódeo-reprimido conduz a expressão de um produto gênico que inativa o produto tóxico do primeiro promotor, sob circunstâncias nas quais os nematódeos não estão presentes, permitindo, assim, um controle mais fino dos efeitos deletérios do produto tóxico
10 no tecido da planta. Similarmente, com o uso de proteínas apresentando efeito deletério em nematódeos, plantas podem ser geneticamente alteradas para expressar tais proteínas deletérias em resposta a ataque de nematódeo.

15 Um número de nematódeos parasitas de plantas, como o SCN, prefere infectar tecidos radiculares. Então, promotores raiz-específicos e raiz-preferenciais são muito úteis para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a nematódeos. Os promotores raiz-específicos e
20 raiz-preferenciais podem reduzir o impacto prejudicial potencial dos genes nematocidas em outras características agronômicas.

Apesar de estes métodos terem potencial para o
25 tratamento de infecção e reprodução de nematódeo, a efetividade destes é altamente dependente das características dos promotores nematódeo-induzidos e nematódeo-reprimidos acima discutidos, assim como as propriedades deletérias das proteínas por estes expressas.
30 Assim, tais fatores como, a força de tais promotores

responsivos a nematódeos, o grau de indução ou repressão, especificidade de tecido, ou similares, podem todos alterar a efetividade destes métodos de resistência a doença. Similarmente, o grau de toxicidade de um produto gênico a nematódeos, a longevidade da proteína após o consumo pelo nematódeo, ou semelhante podem alterar o grau no qual a proteína é útil em controlar nematódeos. Conseqüentemente, há uma necessidade continuada pela identificação de promotores nematódeo-responsivos, raiz-preferenciais, e genes de controle de nematódeos para uso em promover a resistência a nematódeo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Composições e métodos para regular a expressão gênica em uma planta são providos. Composições compreendem novas seqüências de nucleotídeos para um promotor raiz-preferencial e induzido que inicia a transcrição em resposta a alimentação de pragas de nematódeos. Mais particularmente, é provida uma região de iniciação transcricional isolada de soja. Avanços adicionais da invenção compreendem seqüências nucleotídicas definidas em SEQ ID NOS:1-4, fragmentos das seqüências nucleotídicas definidas em SEQ ID NOS:1-4, e as seqüências promotoras vegetais depositadas no "American Type Culture Collection" (ATCC) em 11 de março de 2005, como o Patent Deposit No. PTA-6630. Os avanços da invenção ainda compreendem seqüências de nucleotídeos apresentando pelo menos 85% de identidade de seqüência com as seqüências definidas em SEQ ID NOS:1-4, e que conduzem a expressão raiz preferencial e

nematódeo-induzida de uma seqüência nucleotídica operacionalmente ligada. Também estão incluídos fragmentos funcionais das seqüências definidas como SEQ ID NOs:1-4 que conduzem a expressão preferencial em raiz ou induzida por nematódeo de uma seqüência nucleotídica operacionalmente ligada.

Os avanços da invenção também incluem construções de DNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência heteróloga de nucleotídeos de interesse, onde o referido promotor é capaz de conduzir a expressão da referida seqüência nucleotídica de interesse em uma célula vegetal e o referido promotor compreende uma das seqüências nucleotídicas aqui divulgadas. Os avanços da invenção ainda fornecem vetores de expressão, e plantas ou células vegetais tendo incorporado estavelmente em seus genomas uma construção de DNA acima mencionada. Adicionalmente, as composições incluem sementes transgênicas de tais plantas.

Os avanços de método compreendem um meio para expressar seletivamente uma seqüência nucleotídica em uma planta, compreendendo transformar uma célula vegetal com uma construção de DNA e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal transformada, onde a referida construção de DNA compreendendo um promotor e uma seqüência heteróloga de nucleotídeo, operacionalmente ligada ao referido promotor, na qual o promotor inicia a transcrição raiz-preferencial e induzida por nematódeo da referida seqüência nucleotídica, em uma célula vegetal. Desta forma, as seqüências promotoras são úteis para

controlar, de maneira raiz-preferencial ou induzida, a expressão de seqüências codificantes operacionalmente ligadas.

- 5 À jusante e sob regulação da iniciação transcricional do promotor vai haver uma seqüência de interesse que vai servir para a modificação do fenótipo da planta. Tal modificação inclui modular a produção de um produto endógeno, em quantidade, distribuição relativa, ou
- 10 semelhante, ou produção de um produto de expressão exógena para prover uma nova função ou produto em uma planta. Por exemplo, está abrangida uma seqüência nucleotídica heteróloga que codifica um produto gênico que confere resistência a herbicida, sal, frio, seca, patógeno,
- 15 nematódeo ou inseto.

- Em um avanço adicional, um método para modular a expressão de um gene em uma planta estavelmente transformada é fornecido, compreendendo as etapas de (a) transformar uma
- 20 célula vegetal com uma construção de DNA compreendendo o promotor dos avanços operacionalmente ligado a pelo menos uma seqüência nucleotídica; (b) crescer a célula vegetal sob condições de crescimento vegetal e (c) regenerar uma planta estavelmente transformada a partir de uma célula vegetal
- 25 onde a expressão da seqüência nucleotídica altera o fenótipo da planta.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra a seqüência do promotor DGP de soja.
5 As posições do TATA box e de outros motivos de interesse na seqüência promotora estão indicadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10 Os avanços da invenção compreendem novas seqüências nucleotídicas para promotores de plantas, particularmente um promotor raiz-preferencial e induzido por nematódeo para um gene de proteína dirigente de soja (a partir daqui gene DGP), mais particularmente, o promotor DGP de soja. Em
15 particular, os avanços fornecem moléculas de ácido nucléico isoladas compreendendo a seqüência de nucleotídeos definida em SEQ ID NOs:1-4, e a seqüência promotora de planta depositada em hospedeiros bacterianos no Depósito de Patente No: PTA-6630, em 11 de março de 2005, e fragmentos,
20 variantes, e complementos desta.

Os plasmídeos contendo as seqüências nucleotídicas promotoras vegetais dos avanços foram depositados em 11 de março de 2005 no "American Type Culture Collection" (ATCC),
25 localizado no 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, ao qual foi atribuído o No. de Depósito de Patente PTA-6630. Este depósito vai ser mantido sob os termos do Tratado de Budapeste no Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para Propósitos de Procedimento
30 de Patente (International Recognition of the Deposit of

Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure). Este depósito foi feito meramente como uma conveniência para especialistas na matéria e não é uma admissão que um depósito é exigido sob o artigo 35 do Código Norte Americano §112. O depósito estará, irrevogavelmente e sem restrição ou condição, disponível ao público em virtude da expedição de uma patente. Entretanto, deveria ser entendido que a disponibilidade de um depósito não constitui uma licença para praticar o assunto da invenção em detrimento dos direitos de patente outorgados por uma ação do governo.

As seqüências promotoras dos avanços são úteis para expressar seqüências nucleotídicas operacionalmente ligadas de uma maneira raiz-preferencial e induzida, particularmente de uma maneira induzida por nematódeo. As seqüências também encontram aplicação na construção de vetores de expressão para subsequente transformação de plantas de interesse, como sondas para o isolamento de outras seqüências promotoras do gene DGP, como marcadores moleculares, e os semelhantes.

O promotor de DGP dos avanços foi isolado do DNA genômico de soja. O método específico usado para obter o promotor de DGP da presente invenção está descrito na seção experimental deste pedido.

Os avanços abrangem composições de ácidos nucléicos isolados ou substancialmente purificados. Uma molécula de ácido nucléico "isolada" ou "purificada", ou porção biologicamente ativa desta, é substancialmente livre de outros materiais celulares, ou meio de cultura quando

produzidas por técnicas recombinantes, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros compostos químicos quando sintetizadas quimicamente. Um ácido nucléico "isolado" é substancialmente livre de seqüências (incluindo

5 seqüências codificando proteína) que naturalmente flanqueiam o ácido nucléico (por exemplo, seqüências localizadas nas extremidades 5' e 3' do ácido nucléico) no DNA genômico do organismo do qual o ácido nucléico é derivado. Por exemplo, em vários avanços, a molécula de ácido nucléico pode conter

10 menos do que 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, ou 0.1 kb de seqüências de nucleotídeos que flanqueiam naturalmente a molécula de ácido nucléico no DNA genômico da célula da qual o ácido nucléico é derivado.

15 O gene DGP de soja (SEQ ID NO: 5) é preferencialmente expresso em tecido de raiz de soja e sua expressão era induzida por infecção por nematódeo como indicado por Lynx Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) e experimentos de Agilent microarray que estão melhor

20 discutidos no Exemplo 1. O polipeptídeo codificado pelo gene de DGP de soja é apresentado como a SEQ ID NO: 6. Proteínas dirigentes são encontradas plantas terrestres vasculares e são uma classe de proteínas relativamente recentemente descobertas (Davin et al., (1997) *Science* 275:

25 362-366; Gang et al., (1999) *Chem. Biol.* 6: 143-151; Davin & Lewis (2000) *Plant Physiol.* 123:453-461) e acredita-se estarem envolvidas no acoplamento de monolignol na produção de ligninas e lignanas vegetais. Adicionalmente, acredita-se que as proteínas dirigentes desempenham um papel ligado

ao acoplamento de outros radicais, mas a função exata destas ainda está sendo determinada.

A seqüência promotora de DGP de soja conduz a expressão
5 de seqüências operacionalmente ligadas, de maneira raiz-
preferencial e induzida. Então, seqüências promotoras de
DGP encontram uso na expressão raiz-preferencial e induzida
de uma seqüência de nucleotídeo de interesse
operacionalmente ligada. Particularmente, o promotor dos
10 avanços age para induzir a expressão após a penetração e
infecção de nematódeos nas raízes.

As composições dos avanços incluem moléculas de ácidos
nucléicos compreendendo a seqüência nucleotídica promotora
15 definida em SEQ ID NOs: 1-4. O termo "promotor" significa
uma região regulatória de DNA usualmente compreendendo um
TATA box capaz de direcionar a RNA polimerase II para
iniciar a síntese de RNA no sítio apropriado de iniciação da
transcrição para uma seqüência codificante em particular.
20 Um promotor pode adicionalmente compreender outras
seqüências de reconhecimento posicionadas, geralmente, acima
ou a 5' do TATA box, referidas como elementos acima do
promotor, que influenciam a taxa de iniciação da
transcrição. É reconhecido que uma vez tendo identificado
25 as seqüências de nucleotídeos para as regiões promotoras
aqui divulgadas, está no estado da técnica isolar e
identificar elementos regulatórios adicionais na região 5'
não traduzida acima das regiões promotoras em particular
aqui identificadas. Logo, por exemplo, as regiões
30 promotoras aqui divulgadas podem ainda compreender elementos

regulatórios a montante, tais como aqueles responsáveis por expressão tecidual e temporal da sequência codificante, amplificadores, e similares. Ver particularmente o pedido de patente australiano No. AU-A-77751/94 e os pedidos de patentes Norte-americanos Nos. 5,466,785 e 5,635,618. Da mesma maneira, os elementos promotores que permitem expressão raiz-preferencial e induzida podem ser identificados, isolados, e usados com outros promotores núcleo para conferir expressão induzida. Neste aspecto dos avanços, entende-se por um "promotor núcleo" um promotor sem os elementos do promotor.

No contexto desta divulgação, o termo "elemento regulatório" também se refere a uma sequência de DNA, usualmente, mas nem sempre, acima (5') da sequência codificante de um gene estrutural, que inclui sequências que controlam a expressão da região codificante ao prover o reconhecimento para a RNA polimerase e/ou outros fatores requeridos para iniciar a transcrição em um local particular. Um exemplo de um elemento regulatório que permite o reconhecimento por parte da RNA polimerase ou outros fatores de transcrição para assegurar a iniciação em um sítio em particular é um elemento promotor. Um elemento promotor compreende um elemento promotor núcleo, responsável pela iniciação da transcrição, assim como outros elementos regulatórios (como discutido em alguma parte deste pedido) que modificam a expressão gênica. É para ser entendido que sequências de nucleotídeos, localizadas no interior de introns, ou 3' da região codificante da sequência podem também contribuir para a regulação da expressão de uma

região codificante de interesse. Exemplos de introns adequados incluem, mas não estão limitados a o intron IVS6 de milho, ou o intron LS1 INTRON2 de batata (Vancanneyt, G., et al., (1990) *Mol Gen Genet.*, 220, 245-250). Um elemento regulatório também pode incluir aqueles elementos localizados a jusante (3') do sítio de iniciação da transcrição, ou dentro de regiões transcritas, ou em ambos. No contexto da presente divulgação, um elemento regulatório pós transcricional pode incluir elementos que estão ativos após o início da transcrição, por exemplo, intensificadores de transcrição e de tradução, repressores de transcrição e de tradução, e determinantes de estabilidade de mRNA.

Os elementos regulatórios, ou fragmentos destes, dos avanços podem estar operativamente associados com elementos regulatórios ou promotores, heterólogos, de maneira a modular a atividade do elemento regulatório heterólogo. Tal modulação inclui intensificar ou reprimir a atividade transcricional do elemento regulatório heterólogo, modulando eventos pós-transcricionais, ou tanto intensificando quanto reprimindo a atividade transcricional do elemento regulatório heterólogo e modulando eventos pós-transcricionais. Por exemplo, um ou mais elementos regulatórios, ou fragmentos destes, dos avanços podem estar operativamente associados com promotores: constitutivos, induzidos, ou tecido-específicos; ou fragmentos destes, para modular a atividade de tais promotores dentro de tecidos desejados, dentro de células vegetais.

A seqüência do promotor DGP de soja, quando montada dentro de uma construção de DNA, tal que o promotor é operacionalmente ligado a uma seqüência de nucleotídeo de interesse, permite a expressão da seqüência de nucleotídeos nas células de uma planta estavelmente transformada com esta construção de DNA. O termo "operacionalmente ligado" tem o objetivo de significar que a transcrição ou tradução da seqüência heteróloga de nucleotídeos está sob a influência da seqüência promotora. "Operacionalmente ligado" também tem o objetivo de significar a junção entre duas seqüências de nucleotídeos tal que a seqüência codificante de cada fragmento de DNA permanece na fase de leitura adequada. Desta maneira, as seqüências de nucleotídeos para os promotores dos avanços são fornecidas em construções de DNA juntamente com a seqüência de interesse, tipicamente uma seqüência heteróloga de nucleotídeos, para a expressão na planta de interesse. O termo "seqüência heteróloga de nucleotídeos" tem o intuito de significar uma seqüência que não é naturalmente operacionalmente ligada com a seqüência promotora. Enquanto esta seqüência de nucleotídeo é heteróloga a seqüência promotora, esta pode ser homóloga, ou nativa, ou heteróloga, ou estrangeira, em relação à planta hospedeira.

É reconhecido que os promotores dos avanços podem ser usados com as suas seqüências codificantes nativas para aumentar ou reduzir a expressão, pelos quais resultando em uma mudança no fenótipo da planta transformada.

Modificações das seqüências promotoras isoladas dos avanços podem fornecer uma variação de expressão da seqüência heteróloga de nucleotídeos. Assim, elas podem ser modificadas para serem promotores fracos ou promotores fortes. Geralmente, um "promotor fraco" tem o intuito de significar um promotor que conduz a expressão de uma seqüência codificante em um baixo nível. Um "baixo nível" de expressão tem o propósito de significar expressão em níveis em torno de 1/10.000 transcritos até cerca de 1/100.000 transcritos, até cerca de 1/500.000 transcritos. Reciprocamente, um promotor forte dirige a expressão de uma seqüência codificante em um nível elevado, ou em torno de 1/10 transcritos até cerca de 1/100 transcritos, até cerca de 1/1.000 transcritos.

15

Fragmentos e variantes das seqüências promotoras divulgadas também estão englobados pelos avanços. Um "fragmento" tem a finalidade de significar uma porção da seqüência promotora. Fragmentos de uma seqüência promotora podem manter a atividade biológica e, conseqüentemente, abranger fragmentos capazes de conduzir a expressão induzida de uma seqüência de nucleotídeos operacionalmente ligada. Logo, por exemplo, menos do que a seqüência promotora inteira aqui divulgada pode ser utilizada para dirigir a expressão de uma seqüência de nucleotídeos de interesse operacionalmente ligada, tal como uma seqüência de nucleotídeos codificando uma proteína heteróloga. Logo, SEQ ID NOs: 2, 3 e 4 são fragmentos do promotor de SEQ ID NO: 1. Aqueles com conhecimento na arte são capazes de determinar se tais fragmentos reduzem os níveis de expressão ou alteram

30

a natureza da expressão, por exemplo, expressão constitutiva ou induzida. Alternativamente, fragmentos de uma sequência nucleotídica promotora que são úteis como sondas para hibridização, tal qual descrito abaixo, podem não reter esta
5 atividade regulatória. Assim, fragmentos de uma sequência de nucleotídeos podem variar de pelo menos cerca de 20, cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos ou até seqüências de nucleotídeos completas dos avanços.

10 Assim, um fragmento de uma sequência de nucleotídeos do promotor DGP pode codificar uma porção biologicamente ativa do promotor DGP ou este pode ser um fragmento que pode ser usado como sonda para hibridização ou como oligo iniciador para PCR, usando métodos descritos abaixo. Uma porção
15 biologicamente ativa de um promotor DGP pode ser preparada ao isolar uma porção da sequência de nucleotídeos do promotor DGP e avaliando a atividade desta porção do promotor DGP. Moléculas de ácido nucléico que são fragmentos de uma sequência nucleotídica promotora
20 compreendem, pelo menos, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000 ou até o número de nucleotídeos presente na sequência nucleotídica, aqui divulgada, do promotor completo, por exemplo, 1108 nucleotídeos para SEQ ID NO: 1.

25

Os nucleotídeos de tais fragmentos, usualmente, compreenderão a sequência TATA de reconhecimento da sequência promotora particular. Tais fragmentos podem ser obtidos através do uso de enzimas de restrição para clivar a
30 sequência nucleotídica promotora naturalmente existente,

aqui divulgada; ou podem ser obtidos pelo uso da tecnologia de PCR. Ver particularmente, Mullis et al. (1987) *Methods Enzymol.* 155:335-350, e Erlich, ed. (1989) *PCR Technology* (Stockton Press, New York). Variantes destes fragmentos de
5 promotor, tais como aqueles resultantes de mutagênese sítio direcionada e de um procedimento tal como o "embaralhamento" de DNA, também são abrangidos pelas composições dos avanços.

Um "análogo" dos elementos regulatórios dos avanços
10 inclui qualquer substituição, deleção, ou adição à seqüência de um elemento regulatório fornecido, que referido análogo mantém, pelo menos, uma propriedade regulatória associada com a atividade do elemento regulatório dos avanços. Tais propriedades incluem direcionar especificidade de órgão,
15 especificidade de tecido, ou uma combinação destas, ou atividade temporal, ou atividade de acordo com o desenvolvimento, ou uma combinação destas.

O termo "variantes" tem a finalidade de significar
20 seqüências apresentando similaridade substancial com uma seqüência promotora aqui divulgada. Para seqüências de nucleotídeos, variantes naturalmente existentes tais como estas podem ser identificadas com o uso de técnicas bem conhecidas de biologia molecular, como, por exemplo, com a
25 reação da polimerase em cadeia (PCR) e técnicas de hibridização como apontadas abaixo. Seqüências variantes de nucleotídeos também incluem seqüências nucleotídicas sinteticamente derivadas, como aquelas geradas, por exemplo, pelo uso de mutagênese sítio-direcionada. Geralmente,
30 variantes de uma seqüência de nucleotídeos particular dos

avanços apresentarão, pelo menos, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, até 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou maior identidade de seqüência com aquela seqüência nucleotídica particular como determinado por programas de alinhamento de seqüência aqui descritos em alguma parte, usando parâmetros padrão. Variantes biologicamente ativas também são abrangidas pelos avanços. Variantes biologicamente ativas incluem, por exemplo, as seqüências promotoras nativas dos avanços tendo uma ou mais substituições, deleções, ou inserções. A atividade promotora pode ser medida pelo uso de técnicas tais como análise por Northern blot, medições de atividade repórter feitas a partir de fusões transcricionais, e similares. Ver, por exemplo, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York), daqui em diante "Sambrook", aqui incorporado por referência. Alternativamente, níveis de um gene repórter tal qual o da proteína verde fluorescente (GFP) ou similar produzido sob controle de um fragmento ou variante de um promotor podem ser mensurados. Ver, por exemplo, U.S. Patent No. 6,072,050, aqui incorporado como referência.

Métodos para mutagênese e alterações de seqüência de nucleotídeo são bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; U.S. Patent No. 4,873,192; Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) e as referências citadas nestes.

Seqüências de nucleotídeos promotoras variantes também englobam seqüências derivadas a partir de um procedimento mutagênico e recombinogênico tal como embaralhamento de DNA.

5 Com tal procedimento, uma ou mais seqüências promotoras diferentes podem ser manipuladas para criar um novo promotor possuindo as propriedades desejadas. Dessa maneira, bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas a partir de uma população de polinucleotídeos de seqüência
10 relacionados, compreendendo regiões de seqüência que têm identidade de seqüência substancial e podem ser homologamente recombinadas *in vitro* ou *in vivo*. Estratégias para tal embaralhamento de DNA são conhecidas na arte. Ver, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
15 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Crameri et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Crameri et al. (1998) *Nature* 391:288-291; e U.S. Patent Nos. 5,605,793 and
20 5,837,458.

As seqüências de nucleotídeos dos avanços podem ser usadas para isolar seqüências correspondentes de outros organismos, tais como outras plantas, por exemplo, outras
25 monocotiledôneas. Dessa maneira, métodos tais como PCR, hibridização, e similares podem ser usados para identificar tais seqüências com base em sua homologia de seqüência com a seqüência aqui relatada. Seqüências isoladas baseadas em suas identidades de seqüência com a seqüência promotora
30 completa de DGP aqui determinada ou a fragmentos dessa são

englobados pelos avanços. As regiões promotoras dos avanços podem ser isoladas de qualquer planta, incluindo, mas não limitado a milho (*Zea mays*), couve (*Brassica napus*, *Brassica rapa ssp.*), alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*),
 5 centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girassol (*Helianthus annuus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoins (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium hirsutum*), batata-doce (*Ipomoea batatas*),
 10 mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas (*Citrus spp.*), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa spp.*), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga
 15 (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea europaea*), aveias, cevada, cártamo, verduras, ornamentais, e coníferas.

Em uma abordagem por PCR, iniciadores de oligonucleotídeos podem ser desenhados para uso em reações
 20 de PCR para amplificar seqüências DNA correspondentes de cDNA ou DNA genômico extraído de qualquer planta de interesse. Métodos para desenhar tais iniciadores de PCR e clonagem por PCR são geralmente conhecidos na arte e estão descritos em Sambrook, *supra*. Ver também Innis et al., eds.
 25 (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); e Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Métodos conhecidos de PCR incluem, mas não se
 30 limitam a, métodos usando iniciadores pareados, iniciadores

aninhados, iniciadores únicos específicos, iniciadores degenerados, iniciadores gene-específicos, iniciadores vetor-específicos, iniciadores parcialmente sem correspondência, e similares.

5

Em técnicas de hibridização, toda ou parte de uma sequência de nucleotídeos conhecida é usada como uma sonda que hibridiza seletivamente com outras sequências de nucleotídeos correspondentes presentes em uma população de fragmentos de DNA genômico ou fragmentos de cDNA clonados (por exemplo, bibliotecas de DNA genômico ou de cDNA) de um organismo escolhido. As sondas de hibridização podem ser fragmentos de DNA genômico, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA, ou outros oligonucleotídeos, e podem ser marcados com um grupamento detectável tal como ^{32}P , ou qualquer outro marcador detectável. Assim, por exemplo, sondas para hibridização podem ser feitas marcando oligonucleotídeos sintéticos baseados na sequência promotora de DGP. Métodos para preparação de sondas para hibridização e para construção de bibliotecas genômicas e de cDNA são geralmente conhecidos na arte e estão descritos em Sambrook, *supra*.

Por exemplo, a sequência promotora completa de DGP aqui descrita, ou uma ou mais porções dessa, podem ser usadas como uma sonda capaz de hibridizar especificamente com sequências promotoras de DGP correspondentes. Para alcançar hibridização específica sob uma variedade de condições, tais sondas incluem sequências que são únicas dentre as sequências promotoras de DGP e são, geralmente, de pelo menos cerca de 10 nucleotídeos em comprimento, incluindo

seqüências de pelo menos cerca de 20 nucleotídeos em comprimento. Tais sondas podem ser usadas para amplificar, por PCR, seqüências promotoras correspondentes a DGP de uma planta escolhida. Essa técnica pode ser usada para isolar

5 seqüências codificantes adicionais de uma planta desejada ou como um teste diagnóstico para determinar a presença de seqüências codificantes em uma planta. Técnicas de hibridização incluem rastreamento por hibridização de bibliotecas de DNA plaqueadas (tanto placas ou colônias;

10 ver, por exemplo, Sambrook *supra*).

A hibridização de tais seqüências pode ser conduzida sob condições estringentes. "Condições estringentes" ou "condições de hibridização estringentes" são condições sob

15 as quais uma sonda hibridizará com a sua seqüência alvo a um grau detectavelmente maior do que com outras seqüências (por exemplo, pelo menos 2 vezes sobre o ruído de fundo). Condições estringentes são dependentes de seqüência e serão diferentes em diferentes circunstâncias. Controlando a

20 estringência das condições de hibridização e/ou lavagem, seqüências alvo que são 100% complementares à sonda podem ser identificadas (sondagem homóloga). Alternativamente, condições de estringência podem ser ajustadas para permitir alguma falta de correspondência em seqüências de forma que

25 graus menores de similaridade sejam detectados (sondagem heteróloga). Geralmente, uma sonda é menor que cerca de 1000 nucleotídeos em comprimento, incluindo aquelas de menos de 500 nucleotídeos em comprimento.

Tipicamente, condições estringentes serão aquelas nas quais a concentração de sais é menor do que cerca de 1,5 M de íons de Na, tipicamente na concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íons de Na (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e de pelo menos 60°C para sondas longas (por exemplo, maiores que 50 nucleotídeos). Condições estringentes podem ser alcançadas, também, com a adição de agentes desestabilizantes, tal como formamida.

10 Condições exemplares de baixa estringência incluem hibridização com uma solução tampão de 30 a 35% de formamida, 1 M NaCl, 1% SDS (sódio dodecil sulfato) a 37°C, e uma lavagem em SSC 1X a 2X (SSC 20X = 3,0 M NaCl/0,3 M trissódio citrato) a 50 a 55°C. Condições exemplares de

15 estringência moderada incluem hibridização em 40 a 45% formamida, 1,0 M NaCl, 1% SDS a 37°C, e uma lavagem em SSC 0,5X a 1X entre 55 e 60°C. Condições exemplares de estringência elevada incluem hibridização em 50% formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37°C, e uma lavagem final em SSC 0,1X a

20 60 a 65°C por pelo menos 30 minutos. A duração de hibridização é geralmente menor do que aproximadamente 24 horas, usualmente cerca de 4 a cerca de 12 horas.

Especificidade é tipicamente a função de lavagens pós-hibridização, sendo os fatores críticos a força iônica e a temperatura da solução de lavagem final. Para híbridos DNA-DNA, o ponto de fusão térmica (T_m) pode ser aproximado a

25 partir da equação de Meinkoth e Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{ form}) - 500/L$; onde M é a molaridade de cátions

30 monovalentes, %GC é a porcentagem de nucleotídeos guanosina

e citosina no DNA, % form é a porcentagem de formamida na solução de hibridização, e L é o comprimento do híbrido em pares de bases. T_m é a temperatura (sob definidas força iônica e pH) na qual 50% de uma sequência alvo complementar hibridizam com uma sonda perfeitamente correspondente. T_m é reduzida em cerca de 1°C para cada 1% de falta de correspondência; assim, condições de T_m , hibridização, e/ou de lavagem podem ser ajustadas para hibridizar com sequências de identidade desejada. Por exemplo, se sequências com $\geq 90\%$ de identidade são procuradas, a T_m pode ser diminuída em 10°C. Geralmente, condições estringentes são selecionadas para ser cerca de 5°C menos do que a T_m para a sequência específica e seu complemento em uma força iônica e pH definidos. Contudo, condições severamente estringentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 1, 2, 3, ou 4°C menor do que a T_m ; condições moderadamente estringentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9, ou 10°C menor do que a T_m ; condições de baixa estringência podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15, ou 20°C menor do que a T_m . Usando a equação, composições de hibridização e lavagem, e T_m desejada, aqueles com habilidade comum entenderão que variações na estringência de soluções de hibridização e/ou lavagem são inerentemente descritas. Se o grau desejado de falta de correspondência resulta em uma T_m de menos do que 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida), é preferível aumentar a concentração SSC de forma que uma maior temperatura possa ser usada. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular*

Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); e Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York), daqui
5 em diante "Ausubel". Ver também Sambrook *supra*.

Logo, seqüências isoladas que apresentam atividade promotora induzida e que hibridizam sob condições estridentes com as seqüências promotoras de DGP aqui
10 descritas, ou com fragmentos dessas, são englobadas pelos avanços.

Em geral, seqüências que tem atividade promotora e hibridizam com seqüências promotoras aqui descritas serão
15 pelo menos de 40% a 50% homólogas, cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% a 98% homólogas ou mais com as seqüências descritas. Isto é, a similaridade de seqüência entre seqüências pode variar, compartilhando pelo menos cerca de 40% a 50%, cerca de 60% a 70%, e cerca de 80%, 85%, 90%, 95%
20 a 98% similaridade de seqüência.

Os seguintes termos são usados para descrever os relacionamentos de seqüência entre dois ou mais ácidos nucléicos ou polinucleotídeos: (a) "seqüência referência",
25 (b) "janela de comparação", (c) "identidade de seqüência", (d) "porcentagem de identidade de seqüência", e (e) "identidade substancial".

(a) Como aqui usado, "seqüência referência" é uma seqüência definida usada como base para comparação de
30 seqüências. Uma seqüência referência pode ser um subgrupo

ou a totalidade de uma sequência especificada; por exemplo, como um segmento de um cDNA completo ou de uma sequência gênica completa, ou o cDNA ou sequência gênica completos.

5 (b) Como aqui usado, "janela de comparação" faz referência a um segmento contíguo e específico de uma sequência de polinucleotídeos, caracterizado pelo fato de que a sequência de polinucleotídeos na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (por exemplo, 10 espaços("Gaps")) quando comparada à sequência referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ideal das duas sequências. Geralmente, a janela de comparação é de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos em comprimento, e opcionalmente podem ser de 30, 40, 50, 100, 15 ou mais longa. Aqueles especialistas na arte entendem que para evitar uma alta similaridade para uma sequência referência devido à inclusão de espaços (*gaps*) na sequência de polinucleotídeos, uma penalidade por espaço é tipicamente introduzida e subtraída do número de correspondências.

20 Métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na arte. Assim, a determinação do percentual de identidade de sequência entre quaisquer duas sequências pode ser alcançada usando um algoritmo matemático. Exemplos não limitantes preferidos de tais 25 algoritmos matemáticos são o algoritmo de Myers e Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17; o algoritmo de homologia local de Smith et al. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; o algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; o algoritmo de Pearson e Lipman 30 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448; o algoritmo de

Karlin e Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como em Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.

Implementações de computador desses algoritmos matemáticos podem ser utilizadas para comparação de seqüências para determinar a identidade de seqüência. Tais implementações incluem, mas não são limitadas a: CLUSTAL no programa PC/Gene (disponível pela Intelligenetics, Mountain View, California); o programa ALIGN (Version 2.0); o programa ALIGN PLUS (Version 3.0, copyright 1997); e GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, e TFASTA no pacote de software Wisconsin Genetics Software Package of Genetics Computer Group, Version 10 (disponível pela Accelrys, 9685 Scranton Road, San Diego, CA, 92121, USA). A matriz de pontuação usada na versão 10 do pacote de software Wisconsin Genetics Software Package é BLOSUM62 (ver Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

Alinhamentos usando esses programas podem ser realizados usando os parâmetros padrão. O programa CLUSTAL é bem descrito por Higgins et al. (1988) *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins et al. (1989) *CABIOS* 5:151-153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang et al. (1992) *CABIOS* 8:155-65; e Pearson et al. (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-331. Os programas ALIGN e ALIGN PLUS são baseados no algoritmo de Myers e Miller (1988) *supra*. Uma tabela de peso de resíduos PAM120, uma penalidade por comprimento de espaço de 12, e uma penalidade por espaço de 4 podem ser usadas com o programa ALIGN quando comparando seqüências de aminoácidos. Os programas BLAST de Altschul et al (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 são baseados no algoritmo

de Karlin e Altschul (1990) *supra*. As buscas de nucleotídeos no BLAST podem ser realizadas com o programa BLASTN, pontuação = 100, "wordlength" = 12, para obter seqüências de nucleotídeos homólogas a uma seqüência de
5 nucleotídeos codificando uma proteína dos avanços. Buscas por proteína no BLAST podem ser efetuadas com o programa BLASTX, pontuação = 50, "wordlength" = 3, para obter seqüências de aminoácidos homólogas a uma proteína ou polipeptídeo dos avanços. Para obter alinhamentos com
10 espaços para propósitos de comparação, Gapped BLAST (no BLAST 2.0) pode ser utilizado como descrito em Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, PSI-BLAST (no BLAST 2.0) pode ser usado para efetuar uma busca iterada que detecta relações distantes entre
15 moléculas. Ver Altschul et al. (1997) *supra*. Quando usando BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, BLASTN para seqüências de nucleotídeos, BLASTX para proteínas) podem ser usados. Ver o site do National Center for Biotechnology
20 Information na *internet*. O alinhamento também pode ser efetuado manualmente por inspeção.

A menos que definido ao contrário, os valores de identidade/similaridade de seqüência aqui providos referem-se ao valor obtido usando o programa GAP com parâmetros
25 padrão, ou qualquer programa equivalente. Por "programa equivalente", entende-se qualquer programa de comparação de seqüências que, para quaisquer duas seqüências em questão, gere um alinhamento tendo correspondência de nucleotídeos ou de resíduos de aminoácidos idênticos e um percentual

idêntico de identidade de seqüência quando comparado ao alinhamento correspondente gerado pelo GAP.

O programa GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch (1970) *supra*, para encontrar o alinhamento de duas
5 seqüências completas, que maximiza o número de correspondências e minimiza o número de espaços. GAP considera todas as posições de alinhamento e espaços possíveis e cria o alinhamento com o maior número de bases com correspondência e com o menor de espaços. Isto leva em
10 consideração a provisão de uma penalidade de criação de espaços e uma penalidade de extensão de espaços em unidades de bases com correspondência. GAP deve gerar um saldo de número de penalidades de criação de espaços de correspondências para cada espaço que insere. Se uma
15 penalidade por extensão de espaço maior que zero é escolhida, GAP deve, adicionalmente, fazer um saldo para cada espaço inserido do comprimento do espaço vezes a penalidade por extensão de espaço. Valores padrão de penalidade de criação de espaços e valores de penalidade de
20 extensão de espaços na Versão 10 do pacote de *software* Wisconsin Genetics Software Package para seqüências de proteínas são 8 e 2, respectivamente. Para seqüências de nucleotídeos a penalidade padrão para criação de espaço é de 50, enquanto a penalidade padrão por extensão de espaço é de
25 3. As penalidades de criação e extensão de espaços podem ser expressas como um número inteiro selecionado do grupo de números inteiros consistindo de 0 a 200. Assim, por exemplo, as penalidades de criação e extensão de espaços podem ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30,
30 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou maiores.

(c) Como aqui usado, "identidade de seqüência", ou "identidade" no contexto de duas seqüências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos, faz referência aos resíduos nas duas seqüências que são os mesmos quando alinhadas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação específica. Quando a porcentagem de identidade de seqüência é usada em referência a proteínas, é reconhecido que posições de resíduos que não são idênticos, freqüentemente diferem por substituições de aminoácidos conservadas, onde os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, portanto, não mudam as propriedades funcionais da molécula. Quando seqüências diferem em substituições conservadas, o percentual de identidade de seqüência pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservada da substituição. Seqüências que diferem por tais substituições conservadas são ditas tendo "similaridade de seqüência" ou "similaridade". Meios de fazer esse ajuste são bem conhecidos por especialistas na técnica. Tipicamente, isso envolve pontuar uma substituição conservada como uma parcial, ao invés de uma falta de correspondência completa, aumentando, dessa forma, a porcentagem de identidade de seqüência. Assim, por exemplo, onde um aminoácido idêntico recebe uma pontuação de 1 e uma substituição não conservada recebe uma pontuação de zero, uma substituição conservada recebe uma pontuação entre zero e 1. A pontuação de substituições conservadas é calculada, por exemplo, como

implementado no programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) Como aqui usado, "porcentagem de identidade de
5 sequência" significa o valor determinado comparando-se duas
seqüências otimamente alinhadas em uma janela de comparação,
caracterizado pelo fato de que a parte da seqüência de
polinucleotídeos na janela de comparação pode compreender
adições ou deleções (ex: espaços), se comparada à seqüência
10 referência (que não compreende adições ou deleções) para
alinhamento ótimo das duas seqüências. A porcentagem é
calculada determinando-se o número de posições nas quais a
base de ácido nucléico ou resíduo de aminoácido idêntico
ocorre em ambas as seqüências para produzir o número de
15 posições com correspondência, dividindo o número de posições
com correspondência pelo número total de posições na janela
de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para
produzir a porcentagem de identidade de seqüência.

(e) (i) O termo "identidade substancial" de
20 seqüências de polinucleotídeos significa que um
polinucleotídeo compreende uma seqüência que tem pelo menos
70% de identidade de seqüência, pelo menos 80%, pelo menos
90%, ou pelo menos 95%, comparada a uma seqüência referência
25 usando um dos programas de alinhamento descritos, usando
parâmetros padrão. Um especialista na arte reconhecerá que
esses valores podem ser ajustados apropriadamente para
determinar identidade correspondente de proteínas
codificadas por duas seqüências de nucleotídeos, levando-se
30 em conta degeneração de códon, similaridade de aminoácidos,

posicionamento da fase de leitura, e similares. Identidade substancial de seqüências de aminoácidos para esses propósitos significa, normalmente, identidade de seqüência de pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, e pelo menos 95%.

5

Outra indicação de que seqüências de nucleotídeos são substancialmente idênticas é se duas moléculas hibridizam uma à outra sob condições estringentes. Geralmente, condições estringentes são selecionadas para ser cerca de 10 5°C menos do que a T_m para a seqüência específica em uma força iônica e pH definidos. Contudo, condições estringentes englobam temperaturas na faixa de cerca de 1°C a cerca de 20 C menor do que a T_m , dependendo do grau de estringência desejado, como de outra forma aqui qualificado.

15 Ácidos nucléicos que não hibridizam um ao outro sob condições estringentes são ainda substancialmente idênticos se os polipeptídeos que codificam são substancialmente idênticos. Isso pode ocorrer, por exemplo, quando uma cópia de um ácido nucléico é criada usando a degeneração máxima de

20 códon permitida pelo código genético. Uma indicação de que duas seqüências de ácidos nucléicos são substancialmente idênticas é quando o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucléico é imunologicamente inter-reativo com o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucléico.

25

A seqüência promotora de DGP aqui descrita, assim como variantes e fragmentos dessa, são úteis para engenharia genética de plantas, por exemplo, para a produção de uma planta transformada ou planta transgênica, para expressar um

30 fenótipo de interesse. Como aqui usado, os termos "planta

transformada" e "planta transgênica" referem-se a uma planta que compreende em seu genoma um polinucleotídeo heterólogo. Geralmente, o polinucleotídeo heterólogo é estavelmente integrado no genoma de uma planta transgênica ou transformada, de forma que o polinucleotídeo é passado a sucessivas gerações. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado no genoma sozinho ou como parte de uma construção de DNA recombinante. Deve ser entendido que o termo "transgênico", como aqui usado, inclui qualquer célula, linhagem celular, calo, tecido, parte de planta, ou planta, cujo genótipo foi alterado pela presença de ácido nucléico heterólogo, incluindo aqueles transgênicos alterados inicialmente dessa forma, assim como aqueles criados por cruzamentos sexuais ou propagação assexuada a partir do transgênico inicial. O termo "transgênico", como aqui usado, não engloba a alteração do genoma (cromossômico ou extra-cromossômico) por métodos convencionais de melhoramento de plantas ou por eventos naturalmente ocorrentes, tais como fertilização cruzada aleatória, infecção viral não recombinante, transformação bacteriana não recombinante, transposição não recombinante, ou mutação espontânea.

Um "evento" transgênico é produzido por transformação de células vegetais com uma construção de DNA heterólogo, incluindo um cassete de expressão de ácido nucléico que compreenda um transgene de interesse, a regeneração de uma população de plantas resultantes da inserção do transgene no genoma da planta, e a seleção de uma planta em particular, caracterizada pela inserção em uma localidade do genoma em

particular. Um evento é caracterizado fenotipicamente pela expressão do transgene. No nível genético, um evento é parte da constituição genética de uma planta. O termo "evento" também se refere à progênie produzida por um cruzamento sexuada entre a transformante e outra variedade que inclui o DNA heterólogo.

Como aqui usado, o termo "planta" inclui referência a plantas inteiras, órgãos de plantas (e.g., folhas, caules, raízes, etc.), sementes, células vegetais, e progênie dos mesmos. Partes de plantas transgênicas devem ser entendidas, no escopo dos avanços, por compreender, por exemplo, células vegetais, protoplastos, tecidos, calo, embriões, assim como flores, caules, frutos, óvulos, folhas, ou raízes, originando plantas transgênicas ou a progênie destas, previamente transformada com uma molécula de DNA dos avanços, e, portanto, consistindo pelo menos em parte de células transgênicas.

Como aqui usado, o termo "célula vegetal" inclui, sem limitação, culturas de suspensão de sementes, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen, e micro-esporos. A classe de plantas que pode ser usada nos métodos aqui descritos é geralmente tão ampla quanto a classe de vegetais superiores receptível a técnicas de transformação, incluindo tanto plantas monocotiledôneas quanto dicotiledôneas.

As seqüências promotoras e os métodos aqui descritos são úteis para regular a expressão de qualquer seqüência

heteróloga de nucleotídeos em uma planta hospedeira. Assim, a sequência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada aos promotores aqui descritos pode ser um gene estrutural codificando uma proteína de interesse. Genes de interesse são reflexo dos mercados e interesses daqueles envolvidos no desenvolvimento do cultivo. Cultivos e mercados de interesse mudam, e à medida que nações em desenvolvimento se abrem a mercados mundiais, novos cultivos e tecnologias também emergirão. Além disso, à medida que

10 nosso entendimento de traços e características agronômicas, tais como aumento de produção e de heterose, a escolha de genes para transformação conseqüentemente mudará de acordo. Categorias gerais de genes de interesse para os avanços incluem, por exemplo, aqueles genes envolvidos em

15 informação, tais como dedos de zinco, aqueles envolvidos em comunicação, tais como quinases, e aqueles envolvidos em manutenção, tais como proteínas de choque de calor. Categorias mais específicas de transgenes, por exemplo, incluem genes codificando proteínas conferindo resistência a

20 estresse abiótico, tal como seca, temperatura, salinidade, e toxinas, tais como pesticidas e herbicidas, ou a estresse biótico, tal como ataques por fungos, vírus, bactérias, insetos, e nematódeos, e desenvolvimento de doenças associadas a esses organismos. Várias mudanças em fenótipo

25 são de interesse, incluindo modificar a expressão de um gene em uma planta, alterar o mecanismo de defesa de uma planta a patógeno ou inseto, aumentar a tolerância de planta a herbicidas, alterar o desenvolvimento vegetal para responder a estresse ambiental, e similares. Os resultados podem ser

30 atingidos ao se prover a expressão de produtos heterólogos

ou a expressão aumentada de produtos endógenos em plantas. Alternativamente, os resultados podem ser alcançados provendo-se uma redução de expressão de um ou mais produtos endógenos, particularmente enzimas, transportadores, ou co-
5 fatores, ou afetando a absorção de nutrientes na planta. Essas mudanças resultam em uma mudança de fenótipo da planta transformada.

É reconhecido que qualquer gene de interesse pode ser
10 operacionalmente ligado às seqüências promotoras dos avanços e expresso em uma planta.

Uma construção de DNA compreendendo um desses genes de interesse pode ser usada com técnicas de transformação, tais
15 como aquelas descritas abaixo, para criar resistência a doenças ou insetos em fenótipos vegetais susceptíveis ou para intensificar a resistência a doenças ou insetos em fenótipos vegetais resistentes. Conseqüentemente, os avanços englobam métodos que são direcionados para proteger
20 plantas contra fungos patogênicos, bactérias, vírus, nematódeos, insetos, e similares. Por "resistência a doenças" entende-se que as plantas evitam os sintomas nocivos que são o resultado das interações planta-patógeno.

25 Genes de resistência a doenças e de resistência a insetos, tais como lisozimas, cecropinas, maganinas, ou tioninas para proteção anti-bacteriana, ou proteínas relacionadas com a patogênese (PR), tais como glucanases e quitinases para proteção anti-fúngica, ou endotoxinas de
30 *Bacillus thuringiensis*, inibidores de protease, collagenases,

lectinas, e glicosidases para controlar nematódeos ou insetos são todos exemplos de produtos gênicos úteis.

Genes codificando características de resistência a
5 doenças incluem genes de desintoxicação, tais como contra fumonisina (U.S. Patent No. 5.792.931) avirulência (avr) e genes de resistência a doenças (R) (Jones et al. (1994) *Science* 266:789; Martin et al. (1993) *Science* 262:1432; Mindrinos et al. (1994) *Cell* 78:1089); e similares.

10

Características de resistência a herbicidas podem ser introduzidas em plantas por genes codificando resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de acetolactato sintase (ALS), em particular os herbicidas do tipo
15 sulfoniluréia (por exemplo, o gene de acetolactato sintase (ALS) contendo mutações levando a tal resistência, em particular as mutações S4 e/ou Hra), genes codificando resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de glutamina sintase, tais como fosfinotricina ou basta (por
20 exemplo, o gene *bar*), ou outros genes conhecidos na técnica. O gene *bar* codifica resistência ao herbicida basta, o gene *nptII* codifica resistência aos antibióticos canamicina e geneticina, e o gene ALS codifica resistência ao herbicida clorsulfuron.

25

A resistência ao glifosato é conferida pelo mutante na 5-enol piruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) e genes *aroA*. Ver, por exemplo, U.S. Patent No. 4.940.835 para Shah et al., que descreve a sequência de nucleotídeos de uma
30 forma de EPSPS que pode conferir resistência a glifosato.

- U.S. Patent No. 5.627.061 para Barry et al. também descreve genes codificando enzimas EPSPS. Ver, também, U.S. Patent Nos. 6.248.876; 6.040.497; 5.804.425; 5.633.435; 5.145.783; 4.971.908; 5.312.910; 5.188.642; 4.940.835; 5.866.775; 5 6.225.114; 6.130.366; 5.310.667; 4.535.060; 4.769.061; 5.633.448; 5.510.471; RE 36.449; RE 37.287; e 5.491.288; e publicações internacionais WO 97/04103; WO 97/04114; WO 00/66746; WO 01/66704; WO 00/66747 e WO 00/66748, as quais são aqui incorporadas por referência para esse propósito.
- 10 Resistência a glifosato também é conferida às plantas que expressam um gene que codifica uma enzima glifosato óxido-redutase, como descrito mais completamente em U.S. Patent Nos. 5.776.760 e 5.463.175, as quais são aqui incorporadas por referência para esse propósito. Além disso, resistência
- 15 a glifosato pode ser conferida a plantas pela super-expressão de genes codificando glifosato N-acetiltransferase. Ver, por exemplo, U.S. Patent Application Serial Nos. 10/004.357; e 10/427.692.
- 20 Genes de esterilidade também podem ser codificados em uma construção de DNA e fornecem uma alternativa à poda física. Exemplos de genes usados em tais vias incluem genes masculinos tecido-preferenciais e genes com fenótipos de esterilidade de machos, tais com QM, descrito em U.S. Patent
- 25 No. 5.583.210. Outros genes incluem quinases e aqueles codificando compostos tóxicos tanto para desenvolvimento de gametófito masculino quanto para o feminino.

Características comerciais também podem ser codificadas

30 em um gene ou genes que poderiam aumentar, por exemplo,

amido para produção de etanol, ou prover expressão de proteínas. Outro importante uso comercial de plantas transformadas é a produção de polímeros e bioplásticos, tal como descrito em U.S. Patent No. 5.602.321. Genes, tais como β -cetotiolase, PHBase (polihidroxibutirato sintase), e acetoacetil-CoA redutase (ver Schubert et al. (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) facilitam a expressão de polihidroxialcanoatos (PHAs).

10 Características agronomicamente importantes, que afetam a qualidade do grão, tal como níveis e tipos de óleos, saturados e insaturados, qualidade e quantidade de aminoácidos essenciais, níveis de celulose, amido, e conteúdo de proteína podem ser geneticamente alterados usando os métodos dos avanços. O promotor DGP também é útil em expressar genes envolvidos na utilização e assimilação de nitrogênio em raízes, tal como nitrato redutase (ver, por exemplo, Kaiser, W. M. et al. (2002) *J. Exp. Bot.* 53: 875-882), nitrito redutase (ver, por exemplo, Takahashi, M. et al. (2001) *Plant Physiol.* 126(2): 731-41), glutamina sintetase (ver, por exemplo, Teixeira, J. et al. (2005) *J. Exp. Bot.* 56(412): 663-71), transportadores de nitrato (ver, por exemplo, Orsel, M. et al. (2002) *Plant Physiol.* 129(2): 886-96) e outros, tal como sulfito oxidoreductase (ferredoxina) (Hirasawa, M. et al. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, 1608, 140-148). O promotor DGP também pode ser útil em expressar seqüências de nucleotídeos anti-senso de genes que afetam negativamente o desenvolvimento de raiz sob condições de plantio em alta densidade.

Modificações para características de grãos incluem, mas não estão limitadas a, aumentar o conteúdo de ácido oléico, óleos saturados e insaturados, aumentar níveis de lisina e enxofre, prover aminoácidos essenciais, e modificar amido.

5 Modificações da proteína hordotionina em milho são descritas em U.S. Patent Nos. 5.990.389; 5.885.801; 5.885.802 e 5.703.049; aqui incorporadas por referência. Outro exemplo é a proteína de semente rica em lisina e/ou enxofre codificada pela albumina 2S de soja descrita em U.S. Patent
10 No. 5.850.016, e o inibidor de quimotripsina de cevada, Williamson et al. (1987) *Eur. J. Biochem.* 165:99-106, as descrições dos quais são aqui incorporadas por referência.

Produtos exógenos incluem enzimas e produtos vegetais
15 assim como aqueles de outras fontes incluindo procariotos e outros eucariotos. Tais produtos incluem enzimas, co-fatores, hormônios, e similares.

Exemplos de outros genes aplicáveis e seus fenótipos
20 associados incluem o gene que codifica proteína de capsídeo viral e/ou RNA, ou outros genes virais ou vegetais que conferem resistência viral; genes que conferem resistência a fungos; genes que conferem resistência a insetos; genes que promovem aprimoramento da produção; e genes que conferem
25 resistência a estresse, tal como a desidratação resultante de calor e salinidade, metal tóxico ou elementos traço, ou similares.

Em outros avanços da presente invenção, as seqüências
30 do promotor DGP são operacionalmente ligadas a genes de

interesse que melhoram o crescimento de plantas ou aumentam a produção de cultivos sob condições de alta densidade de plantas. Por exemplo, o promotor de DGP pode ser operacionalmente ligado a seqüências de nucleotídeos expressando genes agronomicamente importantes que resultam em sistemas radiculares primários ou laterais melhorados. Tais genes incluem, mas não são limitados a, transportadores de nutrientes/água e indutores de crescimento. Exemplos de tais genes incluem, mas não são limitados a, H^+ -ATPase de membrana plasmática de milho (MHA2) (Frias et al. (1996) *Plant Cell* 8:1533-44); AKT1, um componente do aparato de absorção de potássio em *Arabidopsis* (Spalding et al. (1999) *J. Gen. Physiol.* 113:909-18); genes RML, que ativam o ciclo de divisão celular nas células apicais de raiz (Cheng et al. (1995) *Plant Physiol.* 108:881); genes de glutamina sintetase de milho (Sukanya et al. (1994) *Plant Mol. Biol.* 26:1935-46); e hemoglobina (Duff et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 27:16749-16752; Arredondo-Peter et al. (1997) *Plant Physiol.* 115:1259-1266; Arredondo-Peter et al. (1997) *Plant Physiol.* 114:493-500 e referências aí citadas). O promotor de DGP também pode ser útil expressando seqüências de nucleotídeos anti-senso de genes que afetam negativamente o desenvolvimento de raiz sob condições de plantio em alta densidade.

A seqüência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada ao promotor de DGP e seus fragmentos ou variantes relacionados biologicamente ativos aqui descritos podem ser uma seqüência anti-senso para um gene alvo. A terminologia "seqüência de DNA de nucleotídeos anti-senso" deve significar uma seqüência que está em orientação inversa à

orientação 5'-3' normal daquela sequência de nucleotídeos. Quando entregue em uma célula vegetal, a expressão da sequência de DNA anti-senso previne a expressão normal da sequência de nucleotídeos de DNA para o gene alvo. A

5 sequência de nucleotídeos anti-senso codifica um transcrito de RNA que é complementar e capaz de hibridizar com o RNA mensageiro (mRNA) endógeno produzido pela transcrição da sequência de nucleotídeos de DNA do gene alvo. Neste caso, a produção da proteína nativa codificada pelo gene alvo é

10 inibida para alcançar uma resposta fenotípica desejada. Modificações das sequências anti-senso podem ser feitas contanto que as sequências hibridizem e interfiram com a expressão do mRNA correspondente. Dessa maneira, construções anti-senso tendo 70%, 80%, 85% de identidade de

15 sequência às sequências anti-senso correspondentes podem ser usadas. Adicionalmente, porções dos nucleotídeos anti-senso podem ser usadas para interromper a expressão do gene alvo. Geralmente, sequências de pelo menos 50 nucleotídeos, 100 nucleotídeos, 200 nucleotídeos, ou maiores podem ser usadas.

20 Assim, as sequências promotoras aqui descritas podem ser operacionalmente ligadas a sequências de DNA anti-senso para reduzir ou inibir a expressão de uma proteína nativa na planta.

25 "RNAi" refere-se a uma série de técnicas relacionadas para reduzir a expressão de genes (Ver, por exemplo U.S. Patent No. 6.506.559). Técnicas mais antigas referidas por outros nomes são, agora, consideradas por confiar no mesmo mecanismo, mas são dados nomes diferentes na literatura.

30 Estas incluem "inibição anti-senso", a produção de

transcritos de RNA anti-senso capazes de suprimir a expressão da proteína alvo, a "co-supressão" ou "supressão senso", que se referem à produção de transcritos de RNA senso capazes de suprimir a expressão de genes estrangeiros
5 idênticos ou substancialmente similares, ou genes endógenos (U.S. Patent No. 5.231.020, aqui incorporada por referência). Tais técnicas confiam no uso de construções resultando no acúmulo de RNA de dupla fita com uma fita complementar ao gene alvo a ser silenciado. A sequência
10 promotora de DGP dos avanços, e seus fragmentos ou variantes relacionados biologicamente ativos aqui descritos, pode ser usada para dirigir a expressão de construções que resultarão em interferência com RNA, incluindo microRNAs e siRNAs.

15 Em um avanço da invenção, construções de DNA compreenderão uma região de iniciação de transcrição compreendendo uma das seqüências de nucleotídeos promotoras aqui descritas, ou variantes ou fragmentos dessas, operacionalmente ligadas a uma seqüência de nucleotídeos
20 heteróloga cuja expressão é para ser controlada pelo promotor dos avanços. Tal construção de DNA é provida com uma pluralidade de sítios de restrição para inserção da seqüência de nucleotídeos de modo a ficar sob regulação transcricional das regiões reguladoras. A construção de DNA
25 pode ainda conter genes marcadores de seleção.

A construção de DNA incluirá, na direção 5'-3' de transcrição, uma região de iniciação da transcrição (por exemplo, um promotor induzido dos avanços), região de
30 iniciação da tradução, uma seqüência heteróloga de

nucleotídeos de interesse, uma região de terminação da tradução e, opcionalmente, uma região de terminação transcricional funcional no organismo hospedeiro. As regiões reguladoras (i.e., promotores, regiões reguladoras de transcrição, e regiões de terminação de tradução) e/ou os polinucleotídeos dos avanços podem ser nativos/análogos à célula hospedeira ou um ao outro. Alternativamente, as regiões reguladoras e/ou o polinucleotídeo dos avanços podem ser heterólogos à célula hospedeira ou um ao outro. Como aqui usado, "heterólogo" em referência a uma seqüência é uma seqüência que é de origem de uma espécie estrangeira, ou, se da mesma espécie, é substancialmente modificada de sua forma nativa em composição e/ou locus genômico por intervenção humana deliberada. Por exemplo, um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo heterólogo é de uma espécie diferente da espécie da qual o polinucleotídeo foi derivado, ou, se da mesma/análoga espécie, um ou ambos são substancialmente modificados de sua forma original e/ou locus genômico, ou o promotor não é o promotor nativo para o polinucleotídeo operacionalmente ligado.

A região de terminação opcionalmente incluída pode ser nativa em relação a região de iniciação da transcrição, pode ser nativa em relação ao polinucleotídeo de interesse operacionalmente ligado, pode ser nativa em relação ao hospedeiro vegetal, ou pode ser derivada de outra fonte (isto é, estrangeira ou heteróloga) para o promotor, o polinucleotídeo de interesse, o hospedeiro, ou qualquer combinação destes. Regiões de terminação convenientes estão disponíveis no plasmídeo Ti de *A. tumefaciens*, tais como as

regiões de terminação de octopina sintase e nopalina sintase. Ver também Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. 5 (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; e Joshi et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:9627-9639. Em avanços particulares, o terminador do gene inibidor de protease de batata II (PinII) é usado. Ver, por 10 exemplo, Keil et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:5641-5650; e An et al. (1989) *Plant Cell* 1:115-122, aqui incorporados por referência em sua integridade.

A construção de DNA compreendendo uma seqüência 15 promotora dos avanços, operacionalmente ligada a uma seqüência heteróloga de nucleotídeos, também pode conter pelo menos uma seqüência de nucleotídeos adicional para um gene a ser co-transformado no organismo. Alternativamente, a(s) seqüência(s) adicional(is) pode ser provida em outra 20 construção de DNA.

Onde for apropriado, a seqüência heteróloga de nucleotídeos cuja expressão é para estar sob o controle da seqüência promotora dos avanços e qualquer seqüência(s) de 25 nucleotídeos adicional(is), pode ser otimizada para aumentar a expressão na planta transformada. Ou seja, essas seqüências de nucleotídeos podem ser sintetizadas usando códon preferenciais de plantas para expressão melhorada. Métodos estão disponíveis na técnica para sintetizar 30 seqüências de nucleotídeos preferenciais de plantas. Ver,

por exemplo, U.S. Patent Nos. 5.380.831 e 5.436.391, e Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, aqui incorporadas por referência.

5 Modificações adicionais de seqüências são conhecidas por intensificar a expressão gênica em um hospedeiro celular. Essas incluem a eliminação de seqüências codificando sinais artificiais de poliadenilação, sinais de processamento exon-intron, repetições do tipo transposons, e
10 outras, tais como seqüências bem caracterizadas que podem ser deletérias à expressão gênica. O conteúdo de G-C da seqüência heteróloga de nucleotídeos pode ser ajustado a níveis médios para um dado hospedeiro celular, como calculado por referência para genes conhecidos expressos na
15 célula hospedeira. Quando possível, a seqüência é modificada para evitar estruturas secundárias em grampo (hairpin) de mRNA previstas.

As construções de DNA podem conter, adicionalmente,
20 seqüências líder 5'. Tais seqüências líder podem atuar para intensificar a tradução. Líderes de tradução são conhecidos na arte e incluem: líderes de picornavírus, por exemplo, líder EMCV (região não codificadora 5' do vírus da encefalomiocardite) (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130); líderes de potivírus, por
25 exemplo, líder TEV (Vírus Etch de Tabaco) (Allison et al. (1986) *Virology* 154:9-20); líder MDMV (Vírus de Mosaico do Milho Anão); proteína ligante de imunoglobulina humana de cadeia pesada (BiP) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353:90-
30 94); líder não traduzida do mRNA da proteína do capsídeo de

vírus do mosaico da alfafa (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325:622-625); líder de vírus de mosaico de tabaco (TMV) (Gallie et al. (1989) *Molecular Biology of RNA*, 237-256); e líder de vírus clorótico de milho (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81:382-385). Ver, também, Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiology* 84:965-968. Outros métodos conhecidos por intensificar a tradução e/ou estabilidade de mRNA também podem ser utilizados, por exemplo, introns, tais como o intron de ubiquitina do milho (Christensen and Quail (1996) *Transgenic Res.* 5:213-218; Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675-689) ou o íntron de AdhI do milho (Kyojuka et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228:40-48; Kyojuka et al. (1990) *Maydica* 35:353-357), e similares.

15

As construções de DNA dos avanços podem incluir, também, intensificadores adicionais, tanto intensificadores de tradução como de transcrição, como pode ser requerido. Essas regiões intensificadoras são bem conhecidas de especialistas na técnica, e podem incluir o códon de iniciação ATG e seqüências adjacentes. O códon de iniciação deve estar na mesma fase de leitura que a seqüência codificadora para assegurar a tradução de toda a seqüência. Os sinais de controle de tradução e códons de iniciação podem ser de uma variedade de origens, tanto natural como sintética. Regiões de iniciação de tradução podem ser providas a partir da fonte da região de iniciação transcricional, ou do gene estrutural. A seqüência também pode ser derivada do elemento regulador selecionado para expressar o gene, e pode ser especificamente modificada de

30

forma a aumentar a tradução do mRNA. É reconhecido que, para aumentar os níveis de transcrição, intensificadores podem ser utilizados em combinação com as regiões promotoras dos avanços. Intensificadores são conhecidos na técnica e
5 destes fazem parte, a região intensificadora SV40, o elemento intensificador 35S, e similares.

Ao preparar a construção de DNA, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados, de forma a prover as
10 seqüências de DNA na orientação correta e, como apropriado, na fase de leitura adequada. Nesse sentido, adaptadores ou ligantes podem ser empregados para juntar os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem ser envolvidas para fornecer sítios de restrição convenientes. Sítios de
15 restrição podem ser adicionados ou removidos, DNA supérfluo pode ser removido, ou outras modificações similares podem ser feitas para as seqüências dos avanços. Com este propósito, mutagênese *in vitro*, reparo de oligo iniciador, restrição, anelamento, re-substituições, por exemplo,
20 transições e transversões, podem estar envolvidas.

Genes repórter ou genes marcadores de seleção podem ser incluídos nas construções de DNA. Exemplos de genes repórter adequados conhecidos na arte podem ser encontrados
25 em, por exemplo, Jefferson et al. (1991) in *Plant Molecular Biology Manual*, ed. Gelvin et al. (Kluwer Academic Publishers), pp. 1-33; DeWet et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:725-737; Goff et al. (1990) *EMBO J.* 9:2517-2522; Kain et al. (1995) *BioTechniques* 19:650-655; e Chiu et al.
30 (1996) *Current Biology* 6:325-330.

Genes marcadores de seleção para seleção de células ou tecidos transformados podem incluir genes que conferem resistência a antibióticos ou resistência a herbicidas.

5 Exemplos de genes marcadores de seleção adequados incluem, mas não são limitados a, genes codificando resistência, cloramfenicol (Herrera Estrella et al. (1983) *EMBO J.* 2:987-992); metotrexato (Herrera Estrella et al. (1983) *Nature* 303:209-213; Meijer et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807-820); higromicina (Waldron et al. (1985) *Plant Mol. Biol.* 5:103-108; Zhijian et al. (1995) *Plant Science* 108:219-227); estreptomicina (Jones et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86-91); espectinomicina (Bretagne-Sagnard et al. (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); bleomicina (Hille et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 7:171-176); sulfonamida (Guerineau et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127-136); bromoxinil (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419-423); glifosato (Shaw et al. (1986) *Science* 233:478-481); fosfinotricina (DeBlock et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518).

20

Outros genes que poderiam ter utilidade na recuperação de eventos transgênicos, mas podem não ser requeridos no produto final, incluiriam, mas não estão limitados a exemplos tais como, GUS (b-glucuronidase; Jefferson (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387), GFP (proteína verde fluorescente; Chalfie et al. (1994) *Science* 263:802), luciferase (Riggs et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(19):8115 e Luehrsen et al. (1992) *Methods Enzymol.* 216:397-414), e os genes de milho codificando para produção de antocianina (Ludwig et al. (1990) *Science* 247:449).

30

As moléculas de ácido nucléico dos avanços são úteis em métodos direcionados para expressar uma seqüência de nucleotídeos em uma planta. Isso pode ser conseguido ao se
5 transformar uma célula vegetal de interesse com uma construção de DNA compreendendo um promotor aqui identificado, operacionalmente ligado a uma seqüência heteróloga de nucleotídeos, e regenerando uma planta estavelmente transformada a partir da referida célula
10 vegetal. Os métodos dos avanços também são direcionados para expressar de forma induzida uma seqüência de nucleotídeos em uma planta. Estes métodos compreendem transformar uma célula vegetal com uma construção de DNA compreendendo um promotor aqui identificado que inicia a
15 transcrição em uma célula vegetal de maneira induzida, operacionalmente ligado a uma seqüência heteróloga de nucleotídeos, e regenerando uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, e sujeitando a planta ao estímulo requerido para induzir a expressão.

20

A construção de DNA, compreendendo a seqüência promotora particular dos avanços, operacionalmente ligada a uma seqüência de nucleotídeos de interesse pode ser usada para transformar qualquer planta. Neste sentido, podem ser
25 obtidas, por exemplo, células vegetais, plantas, tecido vegetal, semente, raiz e similares, geneticamente modificados, isto é, transgênicos ou transformados.

Espécies vegetais adequadas para os avanços incluem,
30 mas não estão limitadas a, (*Zea mays*), *Brassica* sp. (e.g.,

B. napus, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquelas espécies de *Brassica* úteis como fontes de óleo de semente, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*),
 5 milhete (e.g., milheto (*Pennisetum glaucum*), painço (*Panicum miliaceum*), painço português (*Setaria italica*), capim (*Eleusine coracana*), aveias (*Avena spp.*), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum spp.*), soja (*Glycine max*),
 10 tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoins (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata doce (*Ipomoea batatus*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Cofea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas (*Citrus spp.*),
 15 cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa spp.*), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea europaea*), mamão-papaia (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa (*Prunus amygdalus*),
 20 beterraba (*Beta vulgaris*), cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), cebola (*Allium spp.*), tâmaras (*Phoenix spp.*), verduras, plantas ornamentais, e coníferas.

Verduras incluem tomates (*Lycopersicon esculentum*),
 25 alface (e.g., *Lactuca sativa*), feijões (*Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus limensis*), ervilhas (*Lathyrus spp.*), e membros do gênero *Cucumis*, tais como pepino (*C. sativus*), cantalupo (*C. cantalupensis*), e melão (*C. melo*). Ornamentais incluem azaléia (*Rhododendron spp.*), hortênsia (*Macrophylla*
 30 *hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa*

spp.), tulipas (*Tulipa* spp.), narcisos (*Narcissus* spp.), petúncias (*Petunia hybrida*), cravo (*Dianthus caryophyllus*), bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima*), e crisântemo.

5 Coníferas que podem ser empregadas na prática dos avanços incluem, por exemplo, pinheiros tais como pinheiro loblolly (*Pinus taeda*), pinheiro slash (*Pinus elliottii*), pinheiro ponderosa (*Pinus ponderosa*), pinheiro lodgepole (*Pinus contorta*), e pinheiro de Monterey (*Pinus radiata*); Pseudotsuga
10 (*Pseudotsuga menziesii*); cicuta do oeste (*Tsuga canadensis*); espruce Sitka (*Picea glauca*); sequóia (*Sequoia sempervirens*); abetos verdadeiros, tais como abeto prateado (*Abies amabilis*) e balsamo (*Abies balsamea*); e cedros, tais como cedro vermelho (*Thuja plicata*) e cedro-amarelo do Alasca (*Chamaecyparis*
15 *nootkatensis*).

Como aqui usado, "vetor" refere-se a uma molécula de DNA, tal como um plasmídeo, cosmídeo, ou fago de bactéria, para introduzir uma construção de nucleotídeo, por exemplo, um
20 cassete de expressão, em uma célula hospedeira. Vetores de clonagem contêm, tipicamente, um ou um pequeno número de sítios de reconhecimento de endonucleases de restrição, nos quais seqüências de DNA estrangeiras podem ser inseridas de maneira determinável, sem perda de função biológica essencial
25 do vetor, assim como um gene marcador que é adequado para uso na identificação e seleção de células transformadas com o vetor de clonagem. Genes marcadores incluem, tipicamente, genes que conferem resistência à tetraciclina, resistência a higromicina, ou resistência a ampicilina.

Os métodos dos avanços envolvem introduzir uma construção de nucleotídeos em uma planta. Como aqui usado, "introduzir" deve significar apresentar à planta a construção de nucleotídeo de tal forma que a construção ganhe acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos dos avanços não dependem de um método em particular para introduzir uma construção de nucleotídeo a uma planta, apenas que a construção de nucleotídeo ganhe acesso ao interior de pelo menos uma célula da planta. Métodos para introduzir construções de nucleotídeo em plantas são conhecidos na arte, incluindo, mas não se limitando a, métodos de transformação estável, métodos de transformação transiente, e métodos mediados por vírus.

Uma transformação estável é aquela cuja construção de nucleotídeos introduzida em uma planta se integra no genoma da planta e é capaz de ser herdada pela progênie desta. "Transformação transiente" significa que uma construção de nucleotídeo introduzida em uma planta não se integra no genoma da planta.

As construções de nucleotídeos dos avanços podem ser introduzidas em plantas ao colocar plantas em contato com um vírus ou ácidos nucléicos virais. Geralmente, tais métodos envolvem incorporar uma construção de nucleotídeo dos avanços em uma molécula de DNA ou RNA viral. Métodos para introduzir construções de nucleotídeo em plantas e expressar uma proteína nestas codificada, envolvendo moléculas de DNA ou RNA virais, são conhecidos na arte. Ver, por exemplo,

U.S. Patent Nos. 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367, e 5.316.931; aqui incorporadas como referência.

Protocolos de transformação, assim como protocolos para
 5 introduzir seqüências de nucleotídeos em plantas podem
 variar dependendo do tipo de planta ou célula vegetal, por
 exemplo, monocotiledônea ou dicotiledônea, visada para
 transformação. Métodos adequados de introdução de
 seqüências nucleotídicas em células vegetais e a subsequente
 10 inserção destas no genoma de uma planta incluem microinjeção
 (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334),
 eletroporação (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 83:5602-5606, transformação mediada por *Agrobacterium*
 (U.S. Patent Nos. 5.981.840 e 5.563.055), transferência de
 15 gene direta (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.*
 3:2717-2722), e aceleração balística de partícula (ver, por
 exemplo, U.S. Patent Nos. 4.945.050; 5.879.918; 5.886.244;
 5.932.782; Tomes et al. (1995) in *Plant Cell, Tissue, and*
Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips
 20 (Springer-Verlag, Berlin); e McCabe et al. (1988)
Biotechnology 6:923-926). Ver também Weissinger et al.
 (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford et al. (1987)
Particulate Science and Technology 5:27-37 (cebola);
 Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja);
 25 McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (soja); Finer
 and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182
 (soja); Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324
 (soja); Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz);
 Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309
 30 (milho); Klein et al. (1988) *Biotechnology* 6:559-563

(milho); U.S. Patent Nos. 5.240.855; 5.322.783 e 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (milho); Fromm et al. (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (milho); Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature (London)* 311:763-764; U.S. Patent No. 5.736.369 (cereais); Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet et al. (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209 (pólen); Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 e
 10 Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformação mediada por fios de carboneto de silício); D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (eletroporação); Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 e Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413
 15 (arroz); Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (milho via *Agrobacterium tumefaciens*); todas as quais são aqui incorporadas por referência.

As células que foram transformadas podem ser crescidas de acordo com maneiras convencionais. Ver, por exemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Essas plantas podem ser então, crescidas, e polinizadas com a mesma linhagem transformada ou com diferentes linhagens, e o híbrido resultante tendo expressão induzida da
 25 característica fenotípica identificada desejada. Duas ou mais gerações podem ser crescidas para assegurar que a expressão induzida da característica fenotípica desejada seja estavelmente mantida e herdada e, então, sementes colhidas para garantir que a expressão induzida da
 30 característica fenotípica desejada foi atingida. Assim,

como aqui usado, "sementes transformadas" refere-se a sementes que contêm a construção de nucleotídeo estavelmente integrada no genoma da planta.

5 Há uma variedade de métodos para a regeneração de plantas a partir de tecido vegetal. O método de regeneração em particular dependerá do tecido vegetal inicial e a espécie vegetal em particular a ser regenerada. A regeneração, desenvolvimento e cultivo de plantas a partir de transformantes oriundos de um único protoplasto ou de
10 vários explantes transformados são bem conhecidos na técnica (Weissbach and Weissbach, (1988) In.: Methods for Plant Molecular Biology, (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA). Esse processo de regeneração e crescimento inclui,
15 tipicamente, as etapas de seleção de células transformadas, o cultivo destas células individualizadas através de estágios usuais de desenvolvimento embrionário passando pelo estágio de plântula com raiz. Embriões e sementes transgênicas são similarmente regenerados. Os brotos
20 transgênicos enraizados resultantes são, por conseguinte, plantados e em um meio apropriado para crescimento vegetal, tal como solo. Preferencialmente, as plantas regeneradas são autopolinizadas para prover plantas transgênicas homozigotas. Por outro lado, o pólen obtido de plantas
25 regeneradas é utilizado para cruzar com plantas oriundas de sementes de linhagens de importância agronômica. Reciprocamente, pólen de plantas dessas linhagens importantes é usado para polinizar plantas regeneradas. Uma planta transgênica dos avanços contendo um polipeptídeo

desejado é cultivada usando métodos bem conhecidos de qualquer especialista na arte.

Os avanços fornecem composições para rastrear compostos que modulam a expressão em plantas. Os vetores, células, e plantas podem ser usados para rastrear moléculas candidatas antagonistas e a favor do promotor de DGP. Por exemplo, um gene repórter pode ser operacionalmente ligado ao promotor de DGP e expresso como um transgene em uma planta. Compostos a serem testados são adicionados e a expressão do gene repórter é medida para determinar o efeito na atividade promotora.

Os exemplos a seguir são apresentados como forma de ilustração e não como uma forma de limitação.

EXPERIMENTAL

Os avanços são ainda definidos nos Exemplos a seguir, nos quais partes e porcentagens são expressas por peso, e a temperatura em graus Celsius, a menos que dito ao contrário. Técnicas em biologia molecular foram tipicamente realizadas como descrito em Ausubel ou Sambrook, *supra*. Deveria ser entendido que esses Exemplos, enquanto indicando avanços da invenção, são dados por meio de ilustração apenas. A partir da discussão acima e desses Exemplos, um especialista na arte pode averiguar as características essenciais dos avanços e, sem deixar o espírito e escopo desses, pode fazer várias mudanças e modificações para adaptar-se a vários usos e condições. Assim, várias modificações dos avanços, além

daquelas aqui mostradas e descritas, serão aparentes àqueles especialistas na arte a partir da precedente descrição. Pretende-se, também, que tais modificações caiam no escopo das reivindicações em anexo.

5

A descrição de cada referência aqui relatada é aqui incorporada por referência em sua integridade.

Exemplo 1: Identificação do gene DGP

10

O gene da proteína dirigente (DGP) foi identificado como um gene raiz-preferencial usando uma combinação da tecnologia Agilent de microarray com a tecnologia Lynx Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) (ver Brenner S, et al. (2000) *Nature Biotechnology* 18:630-634, Brenner S et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1665-1670).

Análise por microarray Agilent

20

Os experimentos de microarray Agilent foram realizados de acordo com os protocolos Agilent usando chips de genes de 60-meros de soja.

A linhagem Pioneer YB17E e as sementes Bell foram plantadas em uma casa de vegetação (crescidas a 26°C, com um foto-período de 16h luz/8h escuro), e as raízes das plântulas com 10 dias, provenientes de sementes, foram inoculadas com 10000 ovos da raça 3 do Nematódeo do cisto da soja (SCN) por 3 plantas. Tecidos foram coletados 10 dias após a inoculação (ver tabela 1). Os tecidos foram limpos

30

usando água de torneira e foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e estocados a -80°C . O RNA total foi isolado para as análises por microarray.

5 Tabela 1. Tecidos para as análises por Microarray Agilent

Linhagem Soja	Tratamento	Tecidos
Bell	Não infectada	Caule + Folha
Bell	Infectada	Caule + Folha
Bell	Não infectada	Raiz
Bell	Infectada	Raiz
YB17E	Não infectada	Caule + Folha
YB17E	Infectada	Caule + Folha
YB17E	Não infectada	Raiz
YB17E	Infectada	Raiz

Os dados do microarray Agilent permitiram a seleção de genes candidatos que mostraram expressão raiz preferencial e pareceram ser induzidos pela infecção por SCN. Como mostrado na tabela 2, os dados de microarray indicaram que os níveis de expressão do gene DGP em raízes foram 32 vezes e 15 vezes maiores do que em tecidos de folha e raiz em YB17E e Bell, respectivamente. Estes resultados indicaram claramente o padrão de expressão preferencial em raiz. Ao se comparar tecidos infectados com SCN com tecidos não infectados, ficou claro que o SCN induziu a expressão em 30% nas raízes de YB17E e Bell. Em tecidos foliares, a

expressão de DGP foi induzida em YB17E, mas reprimida em Bell.

5 Tabela 2. Análise da expressão do gene DGP por Microarray

	YB17E	Bell
Raiz (Não infectada)	10088	5795
Folha-caule (Não infectada)	319	393
Raiz (Não infectada) / Folha-caule (Não infectada)	32	15
Raiz (Infectada)	13072	7407
Folha-caule (Infectada)	685	232
Raiz (Infectada) / Folha-caule (Infectada)	19	32
Raiz (Infectada) / Raiz (Não infectada)	1.3	1.3
Folha-caule (Infectada) / Folha-caule (Não infectada)	2.1	0.7

Análise Lynx MPSS

10 A tecnologia MPSS envolve a geração de marcas de assinatura de 17 bases a partir de amostras de mRNA que foram transcritas reversamente. As marcas são simultaneamente seqüenciadas e designadas a genes ou ESTs. A abundância dessas marcas recebe um valor numérico que é normalizado a partes por milhão (PPM) que, então, permite a
15 expressão de marca, ou abundância da marca, ser comparada em

diferentes tecidos. Assim, a plataforma MPSS pode ser usada para determinar o padrão de expressão de um gene em particular e seu nível de expressão em diferentes tecidos.

5 A soja do genótipo Pioneer 93B82 foi usada para os experimentos Lynx MPSS. Sementes da linhagem 93B82 da Pioneer foram plantadas em vasos com terra em uma casa de vegetação e crescidas a 26°C, com foto-período de 16h luz/8h escuro. Um total de 10 amostras foi coletado (ver tabela

10 3). Raiz principal, folha trifoliada, e caule que foram coletados dos estágios V3 e V5 foram escolhidos para representar estágios vegetativos do desenvolvimento. O peso fresco igual, do mesmo tipo de tecido, de dois estágios escolhidos foram combinados e triturados em nitrogênio

15 líquido imediatamente após coletados e estocados a -80°C. O mesmo procedimento foi executado para tecidos coletados durante estágios reprodutivos. Raiz lateral, folha trifoliada, caule e pecíolo foram coletados nos estágios R1 e R3. O estágio R1 captura a importante transição do

20 crescimento vegetativo para o crescimento reprodutivo e o R3 é importante porque as vagens estão começando a se formar, o que é particularmente significativo para pesquisa de rendimento. Uma vez que R2 apresenta florescimento completo, as flores foram coletadas neste estágio. As

25 vagens foram coletadas no estágio R3 que é quando se inicia o desenvolvimento de vagem. Amostras de semente foram coletadas nos principais estágios de desenvolvimento de sementes, R4 e R5.

30 Tabela 3: Descrição de amostras Lynx MPSS

Tipo de tecido	Estágio de desenvolvimento*	# de amostras	Comentários
Raiz principal	V2 e V5	1	Raiz principal inteira
Folha jovem	V2 e V5	1	Todas as folhas trifoliadas em uma planta
Caule jovem	V2 e V5	1	Caule inteiro
Raiz lateral	R1 e R3	1	
Folha madura	R1 e R3	1	Folhas Trifoliadas dos 5 nós do topo
Caule maduro	R1 e R3	1	Caule dos 5 nós do topo
Pecíolo	R1 e R3	1	Pecíolo dos 5 nós do topo
Flor	R2	1	Flores abertas
Vagem	R3	1	Vagem inteira
Semente	R4 e R5	1	

O experimento Linx foi executado como descrito por
5 Brenner S, et al. (2000) Nature Biotechnology 18:630-634.

Como apresentado na tabela 4, o gene DGP de soja é expresso apenas em raízes principal e lateral.

Tabela 4. Padrão de Expressão do gene DGP segundo a análise Lynx MPSS

Tecido	Expressão (ppm)
Raiz lateral	567
Raiz principal	345
Caule jovem	0
Caule maduro	0
Folha jovem	0
Folha madura	0
Flor	0
Vagem	0
Semente	0
Pecíolo	0

- 5 O gene de DGP foi então procurado usando a base de dados proprietária de informação de EST para encontrar a distribuição nos tecidos. A pesquisa de distribuição nos tecidos revelou que existe um total de 39 clones ESTs na base de dados de EST de soja que codificam o gene de DGP.
- 10 Trinta e sete dos 39 clones são provenientes de bibliotecas de cDNA de raiz. Estes dados também mostram que DGP tem um padrão de expressão altamente preferencial de raiz. Oligos iniciadores foram desenhados para isolar o promotor de DGP.

15 **Exemplo 2: Isolamento do Promotor do gene de DGP**

Plantas de soja (cultivar Jack) foram crescidas em casa de vegetação a 26°C, com foto-período de 16h luz/8h escuro. Tecidos foliares da cultivar Jack foram usadas para isolamento do gene e do promotor. Os tecidos foliares foram triturados em nitrogênio líquido e o RNA total foi isolado pelo método Tri-pure (Boehringer). O DNA genômico foi então isolado usando o kit DNeasy Plant mini (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

10 Regiões promotoras do gene DGP de soja foram isoladas a partir do DNA genômico de soja usando o kit Universal Genome Walker (Clontech) de acordo com as instruções do fabricante. Os DNAs genômicos digeridos com enzimas de restrição foram ligados com um adaptador para construir grupos de fragmentos de DNA para 'andar' no genoma por PCR usando um oligo específico para DGP (SEQ ID NO: 7) e um oligo adaptador (Clontech). A PCR foi realizada em um volume total de 50 µL de: 10 mM Tris-HCL, pH 8.3; 1.5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.1 mM dNTPs; e 0.25 µM de cada oligo, como apropriado, e 0,5 unidades do mix Advantage Genomic PCR polymerase (Clontech) sob as condições descritas nas instruções da Clontech.

Análise dos produtos amplificados por PCR:

25 Os fragmentos amplificados por PCR com o tamanho esperado foram extraídos individualmente do gel para uma segunda etapa de re-amplificação por PCR com as mesmas condições usadas na PCR inicial. Para a segunda etapa de PCR, um oligo adaptador aninhado (Clontech) e um segundo oligo iniciador DGP-específico (SEQ ID NO 8) foram usados.

Cada produto de segunda etapa de PCR apresentando uma única banda com o tamanho esperado foi clonado em um vetor TA (Invitrogen) de acordo com as instruções dos fornecedores. Clones positivos identificados foram selecionados para
5 seqüenciamento de DNA usando um seqüenciador automático Applied Biosystems 373A (ABI). A análise da seqüência de DNA foi realizada com Sequencer (3.0).

O promotor inteiro de DGP tem 1108 nucleotídeos de
10 comprimento (SEQ ID NO 1). Este contém um típico TATA Box mostrado em negrito, maiúsculo na Figura 1 (posição 1025 a 1030) de SEQ ID NO: 1), Um W-box responsivo à patógeno em negrito, sublinhado na Figura 1 (posição 763-768 de SEQ ID NO: 1) e cinco elementos ATATT mostrados em negrito na
15 Figura 1 (posições 4-8; 21-25; 210-214; 294-298; e 317-321 de SEQ ID NO: 1). O W-box é um elemento responsivo à patógeno (Rushton PJ and Somssich IE. (1998) Current Opinion in Plant Biology 1: 311-315), e o elemento ATATT foi anteriormente identificado como estando presente em outros
20 promotores com expressão específica em raiz (Elmayan & Tepfer M. (1995) Transgenic Res 4:388-396).

Exemplo 3: Atividade do Promotor de DGP Promoter e dos fragmentos deste

25

Para demonstrar que a seqüência de DNA isolada como o promotor de DGP funciona como um promotor, ensaios com soja transgênica foram realizados. Estes ensaios forneceram uma rápida avaliação se a seqüência de DNA testada é capaz de
30 dirigir a expressão gênica.

O promotor completo de 1108 pb (SEQ ID NO: 1) foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico e clonado em um vetor de expressão na frente do gene que codifica a B-glucuronidase (GUS) para testar se o promotor poderia conduzir a expressão do GUS. Três fragmentos do promotor completo de DGP (SEQ ID NO: 1) também foram preparados para teste com planta transgênica de modo a determinar o tamanho mínimo requerido do promotor para conduzir a transcrição em uma célula vegetal. O primeiro fragmento testado (SEQ ID NO: 2) apresentava 813 nucleotídeos de comprimento. O segundo fragmento testado (SEQ ID NO:3) apresentava 518 nucleotídeos de comprimento. O terceiro fragmento testado (SEQ ID NO: 4) apresentava 341 nucleotídeos de comprimento. Estas três deleções também foram clonadas em vetores de expressão na frente do gene GUS. Plantas transgênicas foram criadas de acordo com os protocolos definidos no Exemplo 4.

As plantas transgênicas de soja foram testadas para expressão de GUS. Plantas T0 ou T1 foram imersas em tampão de ensaio GUS contendo 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0,5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6\text{-3H}_2\text{O}$, 0,1% Triton X-100 e 2 mM 5-bromo-4-cloro-3-indol glucoronídeo. As plantas foram incubadas no escuro por 24 horas a 37°C. Substituir a solução de coloração GUS com etanol 100% bloqueou o ensaio e a clorofila foi removida com extração por etanol a 100% (3 x 2 horas) à temperatura ambiente, e o material guardado em etanol 70%. A atividade de GUS foi visualizada e fotografias foram feitas usando uma câmera digital.

Análise do promotor completo (SE ID NO: 1)

Um total de 32 eventos T0 PCR positivos foi identificado, e três plantas por evento contendo a
5 construção com o promotor DGP inteiro foram coradas com a
solução GUS para análise histoquímica. Dois eventos
controle (eventos PCR negativos) também foram testados. Dos
32 eventos T0, 20 eventos foram positivos para coloração com
GUS. Mais de 60% dos eventos positivos mostraram atividade
10 muito alta em raízes, quando comparados com folhas. A
atividade do promotor completo em folhas é principalmente
nas nervuras da folha, e há muito pouca atividade nos
caules.

15 Doze dos 20 eventos GUS positivos foram avançados para
a geração T1 e o padrão de expressão de GUS foi avaliado.
Todos os 12 eventos apresentaram um padrão de expressão
preferencial em raiz. A atividade de GUS em raízes é em
torno de 30 vezes mais alta do que em folhas ou caules.

20

Este dado é consistente com o padrão de expressão
esperado do promotor DGP e confirma seu padrão de expressão
preferencial em raiz. Os eventos controle não apresentaram
qualquer marcação GUS.

25

Análise de Fragmento do Promotor

Três fragmentos do promotor completo de DGP foram
preparados para testes em plantas transgênicas de modo a
30 determinar o comprimento mínimo requerido do promotor para

conduzir a transcrição em uma célula vegetal. O primeiro fragmento testado (SEQ ID No: 2) tinha 813 nucleotídeos de comprimento, compreendendo as posições 295-1108 de SEQ ID NO: 1. O segundo fragmento testado (SEQ ID NO: 3) tinha 518 nucleotídeos de comprimento, compreendendo as posições 591-1108 de SEQ ID NO: 1. O terceiro fragmento testado (SEQ ID NO: 4) tinha 341 nucleotídeos, compreendendo as posições 768-1108 de SEQ ID NO: 1.

Um total de 12 eventos T0 PCR positivos transformados com o primeiro fragmento (SEQ ID NO: 2) foram identificados, e três plantas por evento foram coradas com a solução GUS para análise histoquímica. Dois eventos controle (eventos PCR negativos) também foram testados. Sete dos 12 eventos foram GUS positivos. Todos os eventos GUS positivos apresentaram atividade muito elevada nas raízes quando comparados com as folhas. A atividade nas raízes foi de aproximadamente 30 vezes mais alta do que em folhas. A atividade em folha ocorreu essencialmente nas nervuras da folha, como observado no caso do promotor completo, e houve muito pouca atividade em caules. A atividade do fragmento de 813 PB foi muito similar a do promotor completo, em termos de preferência por tecido e força. Os eventos controle não apresentaram qualquer marcação GUS.

25

Um total de 12 eventos T0 PCR positivos transformados com o segundo fragmento (SEQ ID NO: 3) foram identificados, e três plantas por evento foram coradas com a solução GUS para análise histoquímica. Seis dos 12 eventos foram GUS positivos. Todos os eventos GUS positivos mostraram

atividade fortemente raiz-preferencial. Não houve nenhuma
marcação por GUS nos caules ou folhas destas plantas. A
atividade do fragmento de 518 pb foi mais específica para
raiz do que a do promotor completo, em termos de preferência
5 por tecido, mas a força de marcação foi menor, indicando um
menor nível de atividade. Os eventos controle não
apresentaram qualquer marcação GUS.

Um total de 12 eventos T0 PCR positivos transformados
10 com o terceiro fragmento (SEQ ID NO: 4) foram identificados,
e três plantas por evento foram coradas com a solução GUS
para análise histoquímica. Apenas um entre os 12 eventos
foi GUS-positivo, e tal evento apresentou atividade GUS
muito fraca em folha e caule. Nenhum dos eventos apresentou
15 qualquer marcação em raiz. A atividade do fragmento de 341
pb foi muito similar a dos controles, que não apresentaram
qualquer marcação.

O segundo fragmento de deleção apresentou maior
20 atividade raiz específica, mas a força foi
significativamente reduzida quando comparada com a do
promotor inteiro. Este resultado indica que o fragmento de
DNA das posições 295 a 591 de SEQ ID NO: 1 tem um impacto na
força de expressão de DGP nos tecidos. Este pode conter um
25 elemento (ou mais) atuando em *cis* para atividade
constitutiva. Então o terceiro fragmento de deleção (SEQ ID
NO: 4) mostrou muito pouca atividade nas plantas. Este
resultado indica que o fragmento de DNA das posições 591 a
768 de SEQ ID NO: 1 contém elemento(s) atuando em *cis* para
30 atividade específica em raiz.

Exemplo 4: Preparação de Plantas transgênicas de Soja

As plantas transgênicas de soja do Exemplo 3 foram
5 produzidas de acordo com protocolos a seguir.

Culturas de soja embriogênica em suspensão foram transformadas com vetores contendo o promotor completo de DGP e os 3 fragmentos diferentes através um dispositivo de
10 bombardeamento de partícula. A seguir, as soluções estoque e meios utilizados para transformação e regeneração de plantas de soja:

Soluções estoque

15

Sulfato 100 X Estoque: 37.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.69 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
0.86 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0025 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Halide 100 X Estoque: 30.0 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.083 g KI, 0.0025 g
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

20 **P, B, Mo 100X Estoque:** 18.5 g KH_2PO_4 , 0.62 g H_3BO_3 , 0.025 g
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Fe EDTA 100X Estoque: 3.724 g Na_2EDTA , 2.784 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2,4-D Estoque: 10 mg/mL

Vitamina B5 1000X Estoque: 10.0 g mio-inositol, 0.10 g ácido
25 nicotínico, 0.10 g piridoxina HCl, 1 g tiamina.

Meios (por Litro)

SB196: 10 mL de cada uma das soluções estoque acima, 1 mL de Vitamina B5 estoque, 0.463 g $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 2.83 g KNO_3 , 1 mL 2,4-D estoque, 1 g asparagina, 10 g sacarose, pH 5.7.

SB103: 1 pacote da mistura de sais Murashige & Skoog, 1 mL Vitamina B5 estoque, 750 mg MgCl_2 hexahidrato, 60 g maltose, 2 g gelrite, pH 5.7.

SB166: SB103 suplementado com 5 g de carvão ativado por litro.

SB71-4: Saia B5 de Gamborg (Gibco-BRL No. de catálogo 21153-028), 1 mL vitamina B5 estoque, 30 g sacarose, 5 g agar TC, pH 5.7.

Culturas de soja embriogênica em suspensão (de Jack) foram mantidas em 35 mL de meio líquido (SB196) em um agitador rotacional (150 rpm) à 28 °C com luz fluorescente fornecendo um fotoperíodo de 16h de luz por 8 horas de escuro. As culturas foram subcultivadas a cada duas semanas o inocular 35 mg de tecido em 35 mL de meio líquido fresco.

Culturas de soja embriogênica em suspensão foram transformadas através de dispositivo de bombardeamento de partícula (ver Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73) usando um instrumento DuPont Biolistic PDS1000/He.

O plasmídeo de DNA recombinante usado para expressar DGP::GUS (e os plasmídeos expressando GUS com os fragmentos do promotor de DGP) estava em um plasmídeo de DNA recombinante separado do gene marcador de seleção. Ambos os plasmídeos recombinantes de DNA foram precipitados em partículas de ouro como a seguir. Os DNAs em suspensão

foram adicionados a 50 μ L de uma suspensão de partícula de 0,6 μ m de ouro de 20-60 mg/mL e então combinados com 50 μ L de CaCl_2 (2.5 M) e 20 μ L espermidina (0.1 M). A mistura recebeu um pulso no vortex por 5 vezes, rapidamente
5 centrifugada em uma microcentrífuga por 10 segundos, e o sobrenadante foi removido. As partículas cobertas com DNA foram então lavadas uma vez com 150 μ L de etanol 100%, receberam mais um pulso no vortex e foram novamente centrifugadas, e foram ressuspensas em 85 μ L de etanol
10 anidro. Cinco μ L de cada suspensão de partícula de ouro coberta com DNA foram então depositadas em cada disco microcarreador.

Aproximadamente 150 a 250 mg de culturas em suspensão
15 com duas semanas de idade foram colocadas em uma placa de petri de 60 mm x 15 mm vazia e o líquido residual é removido do tecido usando uma pipeta. O tecido foi colocado cerca de 3,5 polegadas distante de uma tela de retenção e cada placa de tecido foi bombardeada uma vez. A pressão de ruptura da
20 membrana foi ajustada em 650 psi e a câmara foi submetida a um vácuo de -28 polegadas de Hg. Dezoito placas foram bombardeadas, e, após o bombardeamento, o tecido de cada placa foi dividido em dois frascos, e cultivado como descrito acima.

25

Sete dias após o bombardeamento, o meio líquido foi trocado por meio fresco SB196 suplementado com 50 mg/mL de higromicina ou 100 ng/mL de clorsulfuron, dependendo do gene marcador de seleção usado na transformação. O meio seletivo
30 foi renovado semanalmente ou a cada duas semanas. Sete

semanas após o bombardeamento, tecido transformado, verde, foi observado crescendo a partir de agrupamentos embriogênicos necróticos não transformados. Tecidos verdes isolados foram removidos e inoculados em frascos individuais para gerar novas, culturas embriogênicas em suspensão transformadas, propagadas de maneira clonal. Conseqüentemente, cada nova linhagem foi tratada como um evento independente de transformação. Estas suspensões foram então mantidas como suspensões de embriões agrupados em estágio imaturo de desenvolvimento através de subcultura ou foram regeneradas em plantas inteiras por maturação e germinação de embriões somáticos individuais.

Os agrupamentos embriogênicos transformados foram removidos da cultura líquida e colocados em meio sólido com agar (SB166) sem hormônios ou antibióticos por uma semana. Os embriões foram cultivados a 26°C em um programa de fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 horas de escuro composto com lâmpadas fluorescentes e incandescentes. Após uma semana, as culturas foram então transferidas para meio SB103 e mantidas nas mesmas condições de crescimento durante três semanas adicionais. Antes de transferir da cultura líquida para o meio sólido, tecidos das linhagens selecionadas foram testados por PCR para a presença do gene quimérico. Embriões somáticos tornaram-se úteis para germinação após 4 semanas e foram então removidos do meio de maturação e secos em placas de petri por 1 a 5 dias. Os embriões secos foram então plantados em meio SB71-4 e deixados germinar sob as mesmas condições de luz e

germinação descritas acima. Os embriões germinados foram transferidos para solo estéril e crescidos até a maturidade.

Todas as publicações e pedidos de patentes mencionados
5 no relatório descritivo são indicativos do nível dos especialistas aos quais esta invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de patentes são aqui incorporados por referência à mesma medida como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e
10 individualmente indicado para ser incorporado por referência.

Apesar de a presente invenção ser descrita em algum detalhe por meio de ilustração e exemplo para propósitos de
15 clareza de entendimento, será óbvio que certas mudanças e alterações podem ser praticadas no escopo das reivindicações.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

5 <110> Requerente: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

10 <120> Título: Molécula de ácido nucléico isolada, construção de dna, vetor, célula vegetal, planta, métodos para expressar uma sequência nucleotídica em planta e em célula vegetal, método para expressar uma sequência de nucleotídeos preferencialmente em raiz vegetal, método para expressar de maneira induzida uma sequência de nucleotídeos em raiz vegetal

15 <130> Referência do documento: 2000-PCT

<150> No. do pedido de prioridade: US 60/663.815

<151> Data de depósito do pedido de prioridade: 21.03.2005

20 <160> Quantidade de SEQ ID Nos.: 10

<170> Software: FastSEQ for Windows Version 4.0

25 <210> SEQ ID No 1

<211> Comprimento: 1108

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Glycine max

30 <220> Características:

<221> Nome/chave: Sinal TATA

<222> Localização: (1025)...(1030)

<221> Nome/chave: 'misc_feature'

<222> Localização: 4-8, 21-25, 210-214, 294-298, 317-321

35 <223> Outras informações: Motivo de promotor de raiz ATATT

<221> Nome/chave: 'misc_feature'

<222> Localização: (763)...(768)

<223> Outras informações: Elemento W-Box de Resposta a Patógeno

40 <400> Sequência: 1

actatatttg	ttcttttattc	atattcagca	aaaaaaagca	atgcttgtag	ttattttataa	60
gacatagtta	ataaattttt	ttatccttta	ttataaaaatt	ttatttttattc	tttcttgtagc	120
attaattatt	ttgaataaaa	tactttgaat	tatctctttt	ttccctaaaa	agatcgaaga	180
agatgagtat	tttcaataaa	gttgaagata	tatttcaaaa	agtattataa	atttaataacc	240
aataattaaa	ttaattaatt	ttcttaatta	ataaacataa	attaatcaat	tatatattat	300
aattaggaat	aaaaaaatat	ttatctattt	ttcaaccatc	attaatcatt	ccgtaattcc	360
ataattataa	gtaatgaatt	aatagagaat	aagaatgttt	taataaaaatt	atttcaataa	420
ataatttatt	tattattatt	tttaatatgt	gtaaaaaatc	ttaaatatca	atcattttga	480
aatggggaaa	tgggggagta	tatgttagat	ttgtaatcaa	ttgttaaatt	acaactttca	540
tttttgggta	ggtgagtcca	tttgaaaata	aaattatact	tttaattatg	attttataacc	600
caaatcgaaa	atggaactca	aacctttaag	tagccataa	gccaaattag	atgtgttgac	660
tatttggggt	acattgcccc	ttttcaaaga	catgtgcttt	aacgtttgac	ctcaaactgc	720
ccacatgcgt	atgctgcagt	aaataatatc	caaaagttga	atggtcaata	attgtggctg	780
tttggaaggt	gttatctgtc	aagaaaaata	ataatagagg	atcatotcag	ccatgcaact	840
ggattaagcg	gaagataatc	agtaaagcta	tatcttggac	tcacaattaa	tttaattcaat	900
tttaaattcca	acctacgcgg	acgaacgtct	aggaatcact	tggttgctgtt	ttttagcaca	960
tgcatataca	ataattaata	tgaggttggt	tcaaacatca	aagactttca	aatctcaact	1020
ttcttataaa	tagtgctcta	tcttctcatg	gagtagcatc	actacctcag	tatataactca	1080
ctaattggac	aacccttctc	ctacctcc				1108

<210> SEQ ID No.: 2
 <211> Comprimento: 813
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Glycine max

5

<220> Características:
 <221> Nome/chave: Variação
 <222> Localização: (0)...(0)
 <223> Outras informações: Deleção

10

<400> Sequência: 2
 attataatta ggaataaaaa aatattttatc tattttttcaa ccatcattaa tcattccgta 60
 attccataat tataagtaat gaattaatag agaataagaa tgtttttaata aaattatttc 120
 aataaataat ttattttatta ttatttttaa tatgtgtaaa aaatcttaaa tatcaatcat 180
 15 tttgaaatgg ggaaatgggg gagtatatgt tagatttgta atcaattggt aaattacaac 240
 tttcattttt gggtaggtga gtccatttga aaataaaatt atacttttaa ttatgatttt 300
 atacccaaact cgaaaatgga actcaaacct ttaagtagcc cataagccaa attagatgtg 360
 ttgactattt gggttacatt gccccttttc aaagacatgt gctttaacgt ttgacctcaa 420
 actgccaca tgcgtatgct gcagtaaata atatccaaa gttgaatggt caataattgt 480
 20 ggctgttttg aaagtgttat ctgtcaagaa aaataataat agaggatcat ctgagccatg 540
 caactggatt aagcggaaga taatcagtaa agctatatct tggactcaca attaattaat 600
 tcaattttta atccaaccta cgcggacgaa cgtctaggaa tcacttggtg ctgtttttta 660
 gcacatgcat atacaataat taatatgagg ttgtttcaaa catcaaagac tttcaaactc 720
 caactttctt ataaatagtg ctctatcttc tcatggagta gcatcactac ctgagtatat 780
 25 actcactaat tggacaaccc ttctctctacc tcc 813

<210> SEQ ID No.: 3
 <211> Comprimento: 518
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Glycine max

30

<220> Características:
 <221> Nome/chave: Variação
 35 <222> Localização: (0)...(0)
 <223> Outras informações: Deleção 2

<400> Sequência: 3
 40 attttataacc caaatcgaaa atggaactca aacctttaag tagcccataa gccaaattag 60
 atgtgttgac tatttgggtt acattgcccc ttttcaaaga catgtgcttt aacgtttgac 120
 ctcaaactgc ccacatgcgt atgtctgcagt aaataatata caaaagttga atgggtcaata 180
 attgtggctg tttggaaagt gttatctgtc aagaaaaata ataataagagg atcatctcag 240
 ccatgcaact ggattaagcg gaagataatc agtaaagcta tatcttggac tcacaattaa 300
 45 ttaattcaat tttaaattcca acctacgcgg acgaacgtct aggaatcact tgttgctggt 360
 ttttagcaca tgcataataca ataattaata tgagggttgt tcaaactatca aagactttca 420
 aatctcaact ttcttataaa tagtgctcta tcttctcatg gagtagcatc actacctcag 480
 tatatactca ctaattggac aacctttctc ctacctcc 518

50

<210> SEQ ID No.: 4
 <211> Comprimento: 341
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Glycine max

55

<220> Características:
 <221> Nome/chave: Variação
 <222> Localização: (0)...(0)
 <223> Outras informações: Deleção 3

<400> Sequência: 4

5
ataattgtgg ctgtttggaa agtgttatct gtcaagaaaa ataataatag aggatcatct 60
cagccatgca actggattaa gcggaagata atcagtaaag ctatatcttg gactcacaat 120
taattaattc aattttaaat ccaacctacg cggacgaacg tctaggaatc acttgttgct 180
gttttttagc acatgcatat acaataatta atatgaggtt gtttcaaaca tcaaagactt 240
tcaaattctca actttcttat aaatagtgtc ctatcttctc atggagtagc atcactacct 300
cagtatatac tcaactaattg gacaaccctt ctctactctc c 341

<210> SEQ ID No.: 5

10 <211> Comprimento: 1209

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Glycine max

<220> Características:

15 <221> Nome/chave: CDS

<222> Localização: (0) ... (0)

<400> Sequência: 5

cacgaggaca ctcactaatt ggacaaccct tctcctacct cc atg gctaat ttcc
Met Ala Asn Phe

1

ata act ttc ttc att ccc cta gcc cta acc ctc ctt ttc tcc tcc ctc 102
 Ile Thr Phe Phe Ile Pro Leu Ala Leu Thr Leu Leu Phe Ser Ser Leu
 25 5 10 15 20

gtc act gcc agt tac cat caa agc atc tct cca agc ctt cta cgt tct 150
Val Thr Ala Ser Tyr His Gln Ser Ile Ser Pro Ser Leu Leu Arg Ser
25 30 35

30 cgt gag aag ctc acg cac ctt cgc ttc tat ttc cat gaa att ttt act 198
Arg Glu Lys Leu Thr His Leu Arg Phe Tyr Phe His Glu Ile Phe Thr

40 45 50

35 agc gac aaa ccc tct aat ctc gtg atc gac ccc ccc aag gtg gta gcc 246
Ser Asp Lys Pro Ser Asn Leu Val Ile Asp Pro Pro Lys Val Val Ala
 55 60 65

gac tct ccc ctt cca ttt ggg tcc caa gtg gtg atc gag gac cca tta 294
Asp Ser Pro Leu Pro Phe Gly Ser Gln Val Val Ile Glu Asp Pro Leu

40 70 75 80

aca att ggg cct gat gtc gag tcc aaa cag ata ggt aag gcc caa ggg 342
Thr Ile Gly Pro Asp Val Glu Ser Lys Gln Ile Gly Lys Ala Gln Gly
85 90 95 100

45 ttt tac cta tcc gca acc caa agg ccc ggt ttg gag ttg gag ata gtc 390
Phe Tyr Leu Ser Ala Thr Gln Arg Pro Gly Leu Glu Leu Glu Ile Val
 105 110 115

50 atg ggg atg gcc ttg acc ttc tta gaa ggc gaa ttt aac ggt agc agt 438
Met Gly Met Ala Leu Thr Phe Leu Glu Gly Glu Phe Asn Gly Ser Ser
 120 125 130

55 tta agt gtg ttg ggg aga aac aaa atc ttc aat gag gtg agg gag ttg 486
Leu Ser Val Leu Gly Arg Asn Lys Ile Phe Asn Glu Val Arg Glu Leu
135 140 145

cct att att ggt ggc acg ggt gag ttt cgc ttc gca cgt ggc tat atc 534
Pro Ile Ile Gly Gly Thr Gly Glu Phe Arg Phe Ala Arg Gly Tyr Ile
150 155 160

60

```

cta gct agg agt gtc aag gtc gat tac cat aaa ggg gat gct acc gtg 582
Leu Ala Arg Ser Val Lys Val Asp Tyr His Lys Gly Asp Ala Thr Val
165 170 175 180

5 gaa tac aac gct tat gtg tat cat tat tct tcc act agc tct tcg tct 630
Glu Tyr Asn Ala Tyr Val Tyr His Tyr Ser Ser Thr Ser Ser Ser Ser
185 190 195

10 cac gag att ttt aac gat gga gtt cag ttc atg aca gac cct att ctt 678
His Glu Ile Phe Asn Asp Gly Val Gln Phe Met Thr Asp Pro Ile Leu
200 205 210

agc aag att tag atttttaact aatttatgtg ttggaggaag tttataaaaa 730
Ser Lys Ile *
15 215

actttaggaa atttgtatct aaactaactc gatacaatct tctaagtttt actcacataa 790
ataagttcgg aaattagact gcggaagggtg ggggaataaa tccaaatacc aagttgctaa 850
tttactcctt tgaaaactat gcctcggttc agtactataa ataaatttgt tgtcttgtcg 910
20 tacacaaaat gtaagtcttt gttgtagtgc aagttgcgtg agctaaataa cgtgccagtc 970
ttaaaaaattt aagtcctttgt tgtagtacaa gttgcgtgag ctgaataatg tgccgcacct 1030
ttttttttgt tggagattta gaccgtgat tattatgtgt attctgcaat tgaatagata 1090
tagagaaaga gacccggggg ttgaaaactt gatatccatg acaatcatgt aatatatata 1150
tatatacaca cgaaaaataa tactacctcc tcgtttcttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1209

25 <210> SEQ ID No.: 6
<211> Comprimento: 215
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Glycine max

30 <400> Sequência: 6
Met Ala Asn Phe Ile Thr Phe Phe Ile Pro Leu Ala Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15
Phe Ser Ser Leu Val Thr Ala Ser Tyr His Gln Ser Ile Ser Pro Ser
35 20 25 30
Leu Leu Arg Ser Arg Glu Lys Leu Thr His Leu Arg Phe Tyr Phe His
35 40 45
Glu Ile Phe Thr Ser Asp Lys Pro Ser Asn Leu Val Ile Asp Pro Pro
50 55 60
40 Lys Val Val Ala Asp Ser Pro Leu Pro Phe Gly Ser Gln Val Val Ile
65 70 75 80
Glu Asp Pro Leu Thr Ile Gly Pro Asp Val Glu Ser Lys Gln Ile Gly
85 90 95
45 Lys Ala Gln Gly Phe Tyr Leu Ser Ala Thr Gln Arg Pro Gly Leu Glu
100 105 110
Leu Glu Ile Val Met Gly Met Ala Leu Thr Phe Leu Glu Gly Glu Phe
115 120 125
Asn Gly Ser Ser Leu Ser Val Leu Gly Arg Asn Lys Ile Phe Asn Glu
50 130 135 140
Val Arg Glu Leu Pro Ile Ile Gly Gly Thr Gly Glu Phe Arg Phe Ala
145 150 155 160
Arg Gly Tyr Ile Leu Ala Arg Ser Val Lys Val Asp Tyr His Lys Gly
165 170 175
55 Asp Ala Thr Val Glu Tyr Asn Ala Tyr Val Tyr His Tyr Ser Ser Thr
180 185 190
Ser Ser Ser Ser His Glu Ile Phe Asn Asp Gly Val Gln Phe Met Thr
195 200 205
60 Asp Pro Ile Leu Ser Lys Ile
210 215

```

<210> SEQ ID No.: 7
 <211> Comprimento: 25
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

5

<220> Características:
 <223> Outras informações: Oligonucleotídeo iniciador

<400> Sequência: 7
 10 gagagatgct ttgatggtaa ctggc 25

<210> SEQ ID No.: 8
 <211> Comprimento: 306
 <212> Tipo: PRT
 15 <213> Organismo: Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 8
 Met Ala Lys Ala Leu Ser Leu Thr Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ile Ala
 1 5 10 15
 20 Ser Asn Val Gln Ser Ala Arg Leu Leu Asp Glu Val Gln Thr Gln Pro
 20 25 30
 Gln Leu Val Pro Gln Val Pro Glu Glu Glu Asp Asp Ser Pro Gln Ala
 35 40 45
 25 Val Thr Thr Thr Pro Thr Pro Ile Pro Leu Pro Gly Pro Ala Thr Gly
 50 55 60
 Gly Pro Glu Pro Ile Leu Glu Phe Phe Met His Asp Val Leu Gly Gly
 65 70 75 80
 Ser His Pro Ser Ala Arg Val Val Thr Gly Ile Val Ala Gln Thr Glu
 85 90 95
 30 Val Asn Gly Ile Pro Phe Ser Lys Ser Ser Asn Asn Ile Phe Pro Val
 100 105 110
 Asp Asn Ala Val Pro Leu Val Asn Ala Asn Ser Ile Asn Asn Leu Ile
 115 120 125
 35 Asn Pro Asn Thr Ala Pro Leu Leu Thr Gly Leu Ser Gly Ser Gln Ala
 130 135 140
 Asn Thr Val Ile Gln Asn Ser Asn Gly Asn Ser Gln Gly Ser Leu Ser
 145 150 155 160
 Ser Asn Asn Leu Pro Phe Val Thr Thr Gly Gln Leu Pro Pro Ile Ala
 165 170 175
 40 Ala Leu Gln Gln Leu Met Phe Gly Ser Ile Thr Val Val Asp Asp Glu
 180 185 190
 Leu Thr Glu Gly His Glu Leu Gly Ser Ala Ile Ile Gly Arg Ala Gln
 195 200 205
 45 Gly Phe Tyr Leu Ala Ser Ser Leu Asp Gly Thr Ser Gln Thr Leu Ser
 210 215 220
 Leu Thr Val Leu Leu His Glu Asp His Asp His His Asp Thr Leu Asp
 225 230 235 240
 50 Asp Ala Ile Ser Phe Phe Gly Val His Arg Thr Ala Ser His Ala Ser
 245 250 255
 His Ile Ala Val Val Gly Gly Thr Gly Arg Phe Glu His Ala Lys Gly
 260 265 270
 Tyr Ala Val Val Glu Thr Leu His Asn Gln Glu Asp Gln His Val Thr
 275 280 285
 55 Asp Gly His Asp Thr Ile Leu His Phe Ser Val Tyr Leu Thr Tyr Tyr
 290 295 300
 Lys Ala
 305

60

<210> SEQ ID No.: 9
 <211> Comprimento: 25
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sequência artificial

5

<220> Características:
 <223> Outras informações: Oligonucleotídeo iniciador

<400> Sequência: 9
 10 gccatggagg taggagaagg gttgt 25

<210> SEQ ID No.: 10
 <211> Comprimento: 192
 <212> Tipo: PRT
 15 <213> Organismo: Thuja plicata

<400> Sequência: 10
 Met Ala Met Lys Ala Ala Lys Phe Leu His Phe Leu Phe Ile Trp Leu
 1 5 10 15
 20 Leu Val Cys Thr Val Leu Leu Lys Ser Ala Asp Cys His Arg Trp Lys
 20 25 30
 Lys Lys Ile Pro Glu Pro Cys Lys Asn Leu Val Leu Tyr Phe His Asp
 35 40 45
 25 Ile Leu Tyr Asn Gly Ser Asn Lys His Asn Ala Thr Ser Ala Ile Val
 50 55 60
 Gly Ala Pro Lys Gly Ala Asn Leu Thr Ile Leu Thr Gly Asn Asn His
 65 70 75 80
 Phe Gly Asp Val Val Val Phe Asp Asp Pro Ile Thr Leu Asp Asn Asn
 85 90 95
 30 Leu His Ser Thr Pro Val Gly Arg Ala Gln Gly Phe Tyr Phe Tyr Asp
 100 105 110
 Met Lys Asn Thr Phe Asn Ser Trp Leu Gly Phe Thr Phe Val Leu Asn
 115 120 125
 35 Ser Thr Asn Tyr Lys Gly Thr Ile Thr Phe Asn Gly Ala Asp Pro Ile
 130 135 140
 Leu Thr Lys Tyr Arg Asp Ile Ser Val Val Gly Gly Thr Gly Asp Phe
 145 150 155 160
 Leu Met Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ile Ser Thr Asp Ala Tyr Glu Gly
 165 170 175
 40 Asp Val Tyr Phe Arg Leu Arg Val Asn Ile Thr Leu Tyr Glu Cys Tyr
 180 185 190

REIVINDICAÇÕES

1. Uma molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada por compreender uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de:

a) uma seqüência de nucleotídeo compreendendo a sequencia definida em SEQ ID NOs: 1-4 ou um complemento desta;

b) uma seqüência de nucleotídeo compreendendo as seqüências promotoras vegetais dos plasmídeos depositados com o Depósito de Patente No. PTA-6630, ou um complemento desta;

c) uma seqüência de nucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal;

d) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma seqüência apresentando pelo menos 85 % de identidade de seqüência com a seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida seqüência inicia a transcrição na célula vegetal.

2. Construção de DNA, caracterizada pelo fato de que contém uma seqüência de nucleotídeos como definida na reivindicação 1, operacionalmente ligada a uma seqüência heteróloga de nucleotídeos de interesse.

3. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a construção de DNA como definida na reivindicação 2.

4. Célula vegetal, caracterizada pelo fato de que tem incorporada, estavelmente em seu genoma, a construção de DNA como definida na reivindicação 2.

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

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

7. Planta, caracterizada pelo fato de ter incorporada, em seu genoma, a construção de DNA como definida na reivindicação 2.

8. Planta de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

9. Planta de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

10. Semente transgênica da planta como definida na reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a semente contém a construção.

11. Planta de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga de interesse codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, patógeno, ou inseto.

12. Planta de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeo codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

13. Método para expressar uma sequência nucleotídica em uma planta, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir em uma planta uma construção de DNA, cuja construção de DNA compreende um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos de interesse operacionalmente ligada ao referido promotor, onde o referido promotor compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta; e

d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência nucleotídica inicia a transcrição em uma célula vegetal.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

17. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeo codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

18. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga de interesse é preferencialmente expressa na raiz.

19. Método para expressar uma sequência de nucleotídeos em uma célula vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir em uma célula vegetal, uma construção de DNA contendo um promotor operacionalmente ligado a uma sequência heteróloga de nucleotídeos de interesse, onde o referido promotor compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta; e

d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a referida célula vegetal é de uma dicotiledônea.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo patógeno, doença ou inseto.

23. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

24. Método para expressar uma sequência de nucleotídeos preferencialmente em uma raiz vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir, em uma célula vegetal, uma construção de DNA, e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, onde a referida construção de DNA contendo um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada ao referido promotor, na qual o referido promotor compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta;

d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

e) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência da posição 591 a 768 de SEQ ID NO: 1, onde a referida sequência de nucleotídeos inicia a transcrição em uma célula vegetal.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a expressão da referida sequência heteróloga de nucleotídeos altera o fenótipo da referida planta.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

27. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a dicotiledônea é soja.

28. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

29. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

30. Método para expressar de maneira induzida uma sequência de nucleotídeos em uma raiz vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir, em uma célula vegetal, uma construção de DNA, e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, onde a referida construção de DNA contendo um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada ao referido promotor, na qual o referido promotor compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em

SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta; e

d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a expressão da referida sequência heteróloga de nucleotídeos altera o fenótipo da referida planta.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a dicotiledônea é soja.

34. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

35. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

Figura 1

```

actatatttg ttctttatct atattcagca aaaaaaagca atgcttgtag ttatttataa 60
gacatagtta ataaattttt ttatccttta ttataaaatt ttattttatc ttcttgtgc 120
attaattatt ttgaataaaa tactttgaat tatctctttt ttccctaaaa agatcgaaga 180
agatgagtat ttccaataaa gttgaagata tatttcaaaa agtattataa atttaatacc 240
aataattaaa ttaattaatt ttcttaatta ataaacataa attaatcaat tatatattat 300
aattaggaat aaaaaaatat ttatctatct ttcaaccatc attaatcatt ccgtaattcc 360
ataattataa gtaatgaatt aatagagaat aagaatgttt taataaaatt atttcaataa 420
ataatttatt tattattatt tttaatatgt gtaaaaaatc ttaaatatca atcattttga 480
aatggggaaa tgggggagta tatgttagat ttgtaatcaa ttgttaaatt acaactttca 540
tttttgggta ggtgagtgca ttgaaaata aaattatact tttaattatg attttatacc 600
caaatcgaaa atggaactca aacctttaag tagcccataa gccaaattag atgtgttgac 660
tatttggggtt acattgcccc ttttcaaaga catgtgcttt aacgtttgac ctcaaactgc 720
ccacatgcgt atgctgcagt aaataatatc caaaagttga atggtcaata attgtggctg 780
tttgaaagt gttatctgtc aagaaaaata ataatagagg atcatctcag ccatgcaact 840
ggattaagcg gaagataatc agtaaagcta tatcttgac tcacaattaa ttaattcaat 900
tttaaatcca acctacgcgg acgaacgtct aggaatcact tgttgctgtt ttttagcaca 960
tgcatataca ataattaata tgaggttgtt tcaaacatca aagactttca aatctcaact 1020
ttctTATAAA tagtgctcta tcttctcatg gagtagcatc actacctcag tatatactca 1080
ctaattggac aacccttctc ctacctcc 1108

```

RESUMO

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA
5 SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM PLANTA E EM CÉLULA VEGETAL, MÉTODO
PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
PREFERENCIALMENTE EM RAIZ VEGETAL, MÉTODO PARA EXPRESSAR DE
MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM RAIZ
VEGETAL

10

A presente invenção provê composições e métodos para regular a expressão de sequências heterólogas de nucleotídeos em plantas. As composições incluem uma nova
15 sequência de nucleotídeos para um promotor induzido e raiz-preferencial para o gene que codifica uma proteína dirigente de soja. É fornecido um método para expressar uma sequência heteróloga de nucleotídeos em uma planta usando as sequências promotoras aqui divulgadas. O método compreende
20 incorporar, estavelmente em um genoma, uma sequência nucleotídica operacionalmente ligada ao promotor raiz-preferencial da presente invenção e regenerar uma planta estavelmente transformada capaz de expressar a sequência de nucleotídeos.

RESUMO

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM PLANTA E EM CÉLULA VEGETAL, MÉTODO PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS PREFERENCIALMENTE EM RAIZ VEGETAL, MÉTODO PARA EXPRESSAR DE MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM RAIZ VEGETAL

10

A presente invenção provê composições e métodos para regular a expressão de sequências heterólogas de nucleotídeos em plantas. As composições incluem uma nova sequência de nucleotídeos para um promotor induzido e raiz-preferencial para o gene que codifica uma proteína dirigente de soja. É fornecido um método para expressar uma sequência heteróloga de nucleotídeos em uma planta usando as sequências promotoras aqui divulgadas. O método compreende incorporar, estavelmente em um genoma, uma sequência nucleotídica operacionalmente ligada ao promotor raiz-preferencial da presente invenção e regenerar uma planta estavelmente transformada capaz de expressar a sequência de nucleotídeos.

20

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL E PREFERENCIALMENTE EM UMA RAIZ VEGETAL E

5 MÉTODO PARA EXPRESSAR DE MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM UMA RAIZ VEGETAL

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção é relacionada ao campo da biologia molecular, mais particularmente a regulação de expressão gênica em plantas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15

Avanços recentes em engenharia genética vegetal permitiram a construção de plantas apresentando características ou traços melhorados, tais como resistência a doenças, resistência a insetos, resistência a herbicidas, estabilidade ou tempo de validade ampliados do produto final

20 ao consumidor obtido a partir das plantas, e melhoria da qualidade nutricional das partes comestíveis da planta. Logo, um ou mais genes desejados de uma fonte diferente do que a planta, mas construídos para conferir características

25 ou qualidades diferentes ou melhoradas, podem ser incorporados ao genoma da planta. Novos genes podem ser expressos na célula vegetal para exibir o fenótipo desejado tal como uma nova qualidade ou característica.

nematódeo-induzida de uma sequência nucleotídica operacionalmente ligada. Também estão incluídos fragmentos funcionais das sequências definidas como SEQ ID NOs:1-4 que conduzem a expressão preferencial em raiz ou induzida por nematódeo de uma sequência
5 nucleotídica operacionalmente ligada.

Os avanços da invenção também incluem construções de DNA compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma sequência heteróloga de nucleotídeos de interesse, onde o referido promotor
10 é capaz de conduzir a expressão da referida sequência nucleotídica de interesse em uma célula vegetal e o referido promotor compreende uma das sequências nucleotídicas aqui divulgadas. Os avanços da invenção ainda fornecem vetores de expressão, e plantas ou células vegetais tendo incorporado
15 estavelmente em seus genomas uma construção de DNA acima mencionada, bem como um método para obtenção de planta transformada compreendendo transformar, de maneira estável, uma célula vegetal com dita construção de DNA; cultivar a referida célula vegetal transformada sob condições de crescimento vegetal;
20 e regenerar uma planta transformada. Adicionalmente, as composições incluem sementes transgênicas de tais plantas.

Os avanços de método compreendem um meio para expressar seletivamente uma sequência nucleotídica em uma planta,
25 compreendendo transformar uma célula vegetal com uma construção de DNA e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal transformada, onde a referida construção de DNA compreendendo um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeo, operacionalmente ligada ao referido promotor, na
30 qual o promotor inicia a transcrição raiz-preferencial e induzida por nematódeo da referida sequência nucleotídica, em uma célula vegetal. Desta forma, as sequências promotoras são úteis para

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

5 <110> Requerente: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

10 <120> Título: Molécula de ácido nucléico isolada, construção de DNA, vetor, métodos para obtenção de planta transformada, para expressar uma sequência nucleotídica em uma planta, em uma célula vegetal e preferencialmente em uma raiz vegetal e método para expressar de maneira induzida uma sequência de nucleotídeos em uma raiz vegetal

15 <130> Referência do documento: 2000-PCT

<150> No. do pedido de prioridade: US 60/663.815

<151> Data de depósito do pedido de prioridade: 21.03.2005

20 <160> Quantidade de SEQ ID Nos.: 10

<170> Software: FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> SEQ ID No 1

25 <211> Comprimento: 1108

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Glycine max

<220> Características:

30 <221> Nome/chave: Sinal TATA

<222> Localização: (1025)...(1030)

<221> Nome/chave: 'misc_feature'

<222> Localização: 4-8, 21-25, 210-214, 294-298, 317-321

35 <223> Outras informações: Motivo de promotor de raiz ATATT

<221> Nome/chave: 'misc_feature'

<222> Localização: (763)...(768)

<223> Outras informações: Elemento W-Box de Resposta a Patógeno

40 <400> Sequência: 1

	actatatttg	ttctttattc	atattcagca	aaaaaaagca	atgcttgtag	ttattttataa	60
	gacatagtta	ataaattttt	ttatccttta	ttataaaaatt	ttatttttattc	tttcttggtgc	120
	attaatttatt	ttgaataaaa	tactttgaat	tatctctttt	ttccctaaaa	agatcgaaga	180
	agatgagtat	tttcaataaa	gttgaagata	tatttcaaaa	agtattataa	atttaataacc	240
45	aataattaaa	ttaatttaatt	ttcttaatta	ataaacataa	attaatcaat	tatatattat	300
	aattaggaat	aaaaaaatat	ttatctattt	ttcaaccatc	attaatcatt	ccgtaattcc	360
	ataattataa	gtaatgaatt	aatagagaat	aagaatgttt	taataaaaatt	atttcaataa	420
	ataattttatt	tattattatt	tttaatatgt	gtaaaaaatc	ttaaatatca	atcattttga	480
	aatggggaaa	tgggggagta	tatgttagat	ttgtaatcaa	ttgttaaatt	acaactttca	540
50	tttttggtg	ggtgagtcca	tttgaaaata	aaattatact	tttaattatg	attttataacc	600
	caaatcgaaa	atgggaactca	aacctttaag	tagcccataa	gccaaattag	atgtgttgac	660
	tatttggtgt	acattgcccc	ttttcaaaga	catgtgcttt	aacgtttgac	ctcaaactgc	720
	ccacatgcgt	atgctgcagt	aaataatatc	caaaagttga	atgggtcaata	attgtggctg	780
	tttggaagt	gttatctgtc	aagaaaaata	ataatagagg	atcatctcag	ccatgcaact	840
55	ggattaagcg	gaagataatc	agtaaagcta	tatcttggtg	tcacaattaa	ttaattcaat	900
	tttaaatcca	acctacgcgg	acgaacgtct	aggaatcact	tggtgctgtt	tttttagcaca	960
	tgcatataca	ataattaata	tgaggttggt	tcaaacatca	aagactttca	aatctcaact	1020
	ttcttataaa	tagtgctcta	tcttctcatg	gagtagcatc	actacctcag	tatataactca	1080
	ctaattggac	aacctttctc	ctacctcc				1108

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada por compreender uma sequência de nucleotídeo selecionada a
5 partir do grupo consistindo em:

a) uma sequência de nucleotídeo compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOS: 1-4 ou um complemento desta;

10 b) uma sequência de nucleotídeo compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos depositados com o Depósito de Patente No. PTA-6630, ou um complemento desta;

15 c) uma sequência de nucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOS: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal;

20 d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOS: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na célula vegetal.

2. Construção de DNA, caracterizada pelo fato de que
25 contém uma sequência de nucleotídeos como definida na reivindicação 1, operacionalmente ligada a uma sequência heteróloga de nucleotídeos de interesse.

3. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a
30 construção de DNA como definida na reivindicação 2.

4. Método para obtenção de planta transformada caracterizado por compreender:

- transformar, de maneira estável, uma célula vegetal com a construção de DNA como definida na reivindicação 2;
- cultivar a referida célula vegetal transformada sob condições de crescimento vegetal; e
- regenerar uma planta transformada.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

7. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga de interesse codifica um produto gênico que confere resistência a: herbicida, sal, frio, seca, patógeno, ou inseto.

8. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeo codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

9. Método para expressar uma sequência nucleotídica em uma planta, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir em uma planta uma construção de DNA, cuja construção de DNA compreende um promotor e uma
5 sequência heteróloga de nucleotídeos de interesse operacionalmente ligada ao referido promotor, onde o referido promotor compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo em:

10 a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

15 c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta; e

20 d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência nucleotídica inicia a transcrição em uma célula vegetal.

25 10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

5 12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência a: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

10

13. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeo codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

15

14. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga de interesse é preferencialmente expressa na raiz.

20

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

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no
5 Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta; e

10 d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

15

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a referida célula vegetal é de uma dicotiledônea.

20 17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

18. Método de acordo com a reivindicação 15,
25 caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência a: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo patógeno, doença ou inseto.

19. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

5

20. Método para expressar uma sequência de nucleotídeos preferencialmente em uma raiz vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir, em uma célula vegetal, uma construção de DNA, e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, onde a referida construção de DNA contendo um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada ao referido promotor, na qual o referido promotor compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo

10

15 consistindo em:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as

20 sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a

25 transcrição na referida planta;

d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula

30 vegetal.

e) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência da posição 591 a 768 de SEQ ID NO: 1, onde a referida sequência de nucleotídeos inicia a transcrição em uma célula vegetal.

5

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a expressão da referida sequência heteróloga de nucleotídeos altera o fenótipo da referida planta.

10

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

15

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a dicotiledônea é soja.

20

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

25

25. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

30

26. Método para expressar de maneira induzida uma sequência de nucleotídeos em uma raiz vegetal,

caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir, em uma célula vegetal, uma construção de DNA, e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, onde a referida construção de DNA
5 contendo um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada ao referido promotor, na qual o referido promotor compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo em:

10 a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

15 c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta; e

20 d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

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

28. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

5 29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a dicotiledônea é soja.

30. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de
10 nucleotídeos codifica um produto gênico que confere resistência a: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

31. Método de acordo com a reivindicação 26,
15 caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

RESUMO

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA,
VETOR, CÉLULA VEGETAL, PLANTA, MÉTODOS PARA EXPRESSAR UMA
5 SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM PLANTA E EM CÉLULA VEGETAL, MÉTODO
PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
PREFERENCIALMENTE EM RAIZ VEGETAL, MÉTODO PARA EXPRESSAR DE
MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM RAIZ
VEGETAL.

10

A presente invenção provê composições e métodos para
regular a expressão de sequências heterólogas de
nucleotídeos em plantas. As composições incluem uma nova
15 sequência de nucleotídeos para um promotor induzido e raiz-
preferencial para o gene que codifica uma proteína dirigente
de soja. É fornecido um método para expressar uma sequência
heteróloga de nucleotídeos em uma planta usando as
sequências promotoras aqui divulgadas. O método compreende
20 incorporar, estavelmente em um genoma, uma sequência
nucleotídica operacionalmente ligada ao promotor raiz-
preferencial da presente invenção e regenerar uma planta
estavelmente transformada capaz de expressar a sequência de
nucleotídeos.

REIVINDICAÇÕES

1. Uma molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada por compreender uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de:

a) uma seqüência de nucleotídeo compreendendo a sequencia definida em SEQ ID NOs: 1-4 ou um complemento desta;

b) uma seqüência de nucleotídeo compreendendo as seqüências promotoras vegetais dos plasmídeos depositados com o Depósito de Patente No. PTA-6630, ou um complemento desta;

c) uma seqüência de nucleotídeo compreendendo um fragmento de pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal;

d) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma seqüência apresentando pelo menos 85 % de identidade de seqüência com a seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida seqüência inicia a transcrição na célula vegetal.

2. Construção de DNA, caracterizada pelo fato de que contém uma seqüência de nucleotídeos como definida na reivindicação 1, operacionalmente ligada a uma seqüência heteróloga de nucleotídeos de interesse.

3. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a construção de DNA como definida na reivindicação 2.

4. Célula vegetal, caracterizada pelo fato de que tem incorporada, estavelmente em seu genoma, a construção de DNA como definida na reivindicação 2.

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

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

7. Planta, caracterizada pelo fato de ter incorporada, em seu genoma, a construção de DNA como definida na reivindicação 2.

8. Planta de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

9. Planta de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

10. Semente transgênica da planta como definida na reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a semente contém a construção.

11. Planta de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga de interesse codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, patógeno, ou inseto.

12. Planta de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeo codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

13. Método para expressar uma sequência nucleotídica em uma planta, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir em uma planta uma construção de DNA, cuja construção de DNA compreende um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos de interesse operacionalmente ligada ao referido promotor, onde o referido promotor compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta; e

d) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma seqüência apresentando pelo menos 85 % de identidade de seqüência com a seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida seqüência nucleotídica inicia a transcrição em uma célula vegetal.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a seqüência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

17. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a seqüência heteróloga de nucleotídeo codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

18. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a seqüência nucleotídica heteróloga de interesse é preferencialmente expressa na raiz.

19. Método para expressar uma seqüência de nucleotídeos em uma célula vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir em uma célula vegetal, uma construção de DNA contendo um promotor operacionalmente ligado a uma seqüência heteróloga de nucleotídeos de interesse, onde o referido promotor compreende uma seqüência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

a) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo a seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo as seqüências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida seqüência inicia a transcrição na referida planta; e

d) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma seqüência apresentando pelo menos 85 % de identidade de seqüência com a seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a referida célula vegetal é de uma dicotiledônea.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a referida dicotiledônea é soja.

22. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo patógeno, doença ou inseto.

23. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a sequência nucleotídica heteróloga codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

24. Método para expressar uma sequência de nucleotídeos preferencialmente em uma raiz vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir, em uma célula vegetal, uma construção de DNA, e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, onde a referida construção de DNA contendo um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada ao referido promotor, na qual o referido promotor compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida sequência inicia a transcrição na referida planta;

d) uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência apresentando pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida sequência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

e) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência da posição 591 a 768 de SEQ ID NO: 1, onde a referida sequência de nucleotídeos inicia a transcrição em uma célula vegetal.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a expressão da referida sequência heteróloga de nucleotídeos altera o fenótipo da referida planta.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

27. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a dicotiledônea é soja.

28. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

29. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

30. Método para expressar de maneira induzida uma sequência de nucleotídeos em uma raiz vegetal, caracterizado pelo fato de que o referido método consiste em introduzir, em uma célula vegetal, uma construção de DNA, e regenerar uma planta transformada a partir da referida célula vegetal, onde a referida construção de DNA contendo um promotor e uma sequência heteróloga de nucleotídeos operacionalmente ligada ao referido promotor, na qual o referido promotor compreende uma sequência nucleotídica selecionada do grupo consistindo de:

a) uma sequência de nucleotídeos compreendendo a sequência definida em SEQ ID NOs: 1-4;

b) uma sequência de nucleotídeos compreendendo as sequências promotoras vegetais dos plasmídeos designados no Depósito de Patente No: PTA-6630;

c) uma sequência de nucleotídeos compreendendo pelo menos 200 nucleotídeos contíguos da sequência definida em

SEQ ID NOs: 1-4; onde a referida seqüência inicia a transcrição na referida planta; e

d) uma seqüência de nucleotídeos compreendendo uma seqüência apresentando pelo menos 85 % de identidade de seqüência com a seqüência definida em SEQ ID NOs: 1-4, onde a referida seqüência inicia a transcrição em uma célula vegetal.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a expressão da referida seqüência heteróloga de nucleotídeos altera o fenótipo da referida planta.

32. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a planta é uma dicotiledônea.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a dicotiledônea é soja.

34. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a seqüência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que confere resistência à: herbicida, sal, frio, seca, nematódeo, patógeno, doença ou inseto.

35. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a seqüência heteróloga de nucleotídeos codifica um produto gênico que intensifica a assimilação de nitrogênio na raiz.

RESUMO

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, CONSTRUÇÃO DE DNA, VETOR, MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE PLANTA TRANSFORMADA, PARA EXPRESSAR UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA EM UMA PLANTA, EM UMA CÉLULA VEGETAL E PREFERENCIALMENTE EM UMA RAIZ VEGETAL E MÉTODO PARA EXPRESSAR DE MANEIRA INDUZIDA UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS EM UMA RAIZ VEGETAL

10 A presente invenção provê composições e métodos para regular a expressão de sequências heterólogas de nucleotídeos em plantas. As composições incluem uma nova sequência de nucleotídeos para um promotor induzido e raiz-preferencial para o gene que codifica uma proteína dirigente de soja. É fornecido um método para expressar uma sequência heteróloga de nucleotídeos em uma planta usando as sequências promotoras aqui divulgadas. O método compreende incorporar, estavelmente em um genoma, uma sequência nucleotídica operacionalmente ligada ao promotor raiz-preferencial da presente invenção e regenerar uma planta estavelmente transformada capaz de expressar a sequência de nucleotídeos.