República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0916773-0 B1

(22) Data do Depósito: 19/06/2009

(45) Data de Concessão: 19/12/2023

(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR, SEQUÊNCIA PROMOTORA DE PLANTA DE MILHO, BEM COMO MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA DE MILHO, CONTROLE DE INSETOS PESTE ALVO E PROTEÇÃO DE TECIDOS REPRODUTIVOS DA PLANTA DE MILHO

(51) Int.Cl.: A01H 1/00; A01H 9/00.

(30) Prioridade Unionista: 14/07/2008 US 12/172,535.

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.

(72) Inventor(es): MIKYONG LEE; MICHAEL NUCCIO; JOSEPH CLARKE.

(86) Pedido PCT: PCT US2009047873 de 19/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/008760 de 21/01/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/01/2011

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR, CÉLULA, SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS HETERÓLOGA, SEQUÊNCIA PROMOTORA DE PLANTA, BEM COMO MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA, CONTROLE DE INSETOS PESTE ALVO E PROTEÇÃO DE TECIDOS REPRODUTIVOS DA PLANTA. A presente invenção se refere a sequências reguladoras. Em particular, a invenção se refere a uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição dirigindo a expressão de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado em tecidos de não pólen, mas não ou substancialmente não é expressa no pólen. A invenção se refere, ainda, a genes quiméricos e a cassetes de expressão compreendendo a referida sequência regulatória e às plantas transgênicas compreendendo os referidos genes quiméricos e cassetes de expressão.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR, SEQUÊNCIA PROMOTORA DE PLANTA DE MILHO, BEM COMO MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA PLANTA TRANSGÊNICA DE MILHO, CONTROLE DE INSETOS PESTE ALVO E PROTEÇÃO DE TECIDOS REPRODUTIVOS DA PLANTA DE MILHO".**

A presente invenção refere-se à biotecnologia vegetal e se relaciona com sequências reguladoras. Em particular, a invenção se relaciona com uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição dirigindo a expressão de polinucleotídeo de interesse codificando proteínass operavelmente associado em basicamente todos os tecidos vegetais, mas excluindo essencialmente a expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa. A invenção se relaciona ainda com genes quiméricos e cassetes de expressão compreendendo a referida sequência reguladora em associação com um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas expressável e com plantas transgênicas compreendendo os referidos genes quiméricos e cassetes de expressão, respectivamente, expressando o polinucleotídeo de interesse codificando a proteína basicamente em todos os tecidos vegetais, mas excluindo essencialmente a expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Em muitas culturas agrícolas tais como milho, pragas devastadoras tendem a se alimentar nos tecidos vegetativos tais como as folhas, caules e raízes e também nos tecidos reprodutores tais como a espiga. Uma técnica usada para proteger as plantas das pragas é a aplicação de compostos químicos. Uma técnica alternativa envolve recombinação genética, em que um ou mais genes são introduzidos na planta para expressar produtos

de proteína que estão direta ou indiretamente envolvidos no controle de pragas. Os produtos de proteína correntes produzidos por recombinação genética são expressos constitutivamente, isto é, por toda a planta em qualquer altura e na maior parte dos tecidos e órgãos. Esses produtos de proteína são também expressados especificamente, quer em resposta a estímulos específicos ou confinados a células ou tecidos específicos. Em contraste, a presente invenção inclui a expressão da proteína ou do polinucleotídeo de interesse em basicamente todos os tecidos vegetais, mas exclui essencialmente a expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Vários genes com características de controle de insetos visam a fase larvar de desenvolvimento. Sob certas circunstâncias, estas proteínas afetam também insetos que não são os visados, os quais não são pragas do milho, mas que se alimentam ocasionalmente do pólen do milho. Estes insetos podem ser prejudicados por proteínas inseticidas expressas no tecido do pólen. Isto foi visto como um problema nos primeiros casos de milho BT que tinha elevada expressão de proteína inseticida no pólen. Esta questão foi abordada em eventos posteriores de milho BT através do desenvolvimento de sistemas de expressão transgênica alternativos. Estes novos eventos permaneceram eficazes contra pragas-alvo e acumularam menos proteína inseticida no pólen, mas são ainda vistos como potencialmente perigosos para pragas não visadas devido à presença de proteína inseticida no pólen.

Em alguns casos, genes úteis com características de controle de insetos podem também comprometer o desenvolvimento de estruturas reprodutoras da planta tais como, por exemplo, o pendão.

É, deste modo, desejável fornecer plantas, particularmente plantas de milho que excluam a expressão do transgene nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta tais como os tecidos do pólen e/ou do pendão. Isto pode ser conseguido no escopo da presente invenção fornecendo uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição dirigindo a expressão de uma

proteína operavelmente associada codificando um polinucleotídeo de interesse basicamente para todos os tecidos vegetais, mas excluindo essencialmente a expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras masculinas da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa. Esta sequência de nucleotídeos reguladora pode então ser usada para desenvolver sistemas de expressão que permitem a acumulação efetiva do polipeptídeo ou de proteína de interesse tal como, por exemplo, uma proteína inseticida, em tecidos em que as pragas-alvo normalmente se alimentam, e eliminar ou reduzir o acúmulo de proteína inseticida em tecidos ou órgãos não alvo e/ou nos tecidos que podem ser comprometidos pelo polipeptídeo ou proteína de interesse.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica compreendendo estavelmente integrado no seu genoma um construto de polinucleotídeo quimérico, particularmente um construto quimérico, compreendendo um polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, associado a e/ou sob controle de uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição dirigindo a expressão do referido polinucleotídeo de interesse codificando proteínas em basicamente todos os tecidos da referida planta, particularmente os tecidos de que os insetos-alvo normalmente se alimentam, mas excluindo essencialmente os tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, o polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, não é transcrito de forma significativa nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente no tecido do pólen e/ou do pendão da planta transgênica de acordo com a invenção. Portanto, essencialmente nenhuma expressão de polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotí-

deo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, ocorre nos tecidos das estruturas reprodutivas masculinas da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, e somente quantidades residuais do produto de expressão, se houver, podem ser detectadas nos referidos tecidos, que não são suficientes para o produto de expressão cumprir a sua função biológica prevista nos referidos tecidos, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, e desse modo também não exibe quaisquer efeitos tóxicos nos insetos que se alimentam nos referidos tecidos ou nas estruturas reprodutoras da planta.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma planta transgênica como aqui descrito, em que um construto de polinucleotídeo quimérico, particularmente um construto de DNA quimérico, compreende um polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, operavelmente associado a e/ou sob controle operacional de uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição e é obtenível a partir de um gene codificando um fator de despolimerização de actina 3 (ABP3), cujo polipeptídeo ou proteína é altamente expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, o referido gene de fator de despolimerização de actina 3 (ABP3) é obtenível a partir do milho.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma planta transgênica como aqui descrito, em que um construto de polinucleotídeo quimérico, particularmente um construto de DNA quimérico, compreende um polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, operavelmente associado a e/ou sob controle operacional de uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição e é obtenível a partir de um gene representado por uma sonda de DNA, particularmente uma sonda de DNA exibindo uma sequência de DNA como mostrado

nas SEQ ID NOs: 47 até 56, cuja sonda de DNA mostra um padrão de sinal nas amostras de tecidos, o qual é indicativo da expressão do referido gene em todos os tecidos e sem ou substancialmente sem expressão no pólen.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora conforme aqui descrita, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição e medeia a expressão de um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associada na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, cuja sequência reguladora pode ser obtida em uma reação de PCR a partir de um padrão de DNA genômico de *Zea mays* usando

i) um primeiro iniciador que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 1, particularmente um primeiro iniciador da SEQ ID NO: 1; ou

ii) segundo iniciador que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 2, particularmente um segundo iniciador de; SEQ ID NO: 2; ou

iii) um primeiro iniciador como um iniciador direto que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 1 e um segundo iniciador como um iniciador reverso o qual tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma

sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 2, particularmente o iniciador direto de SEQ ID NO: 1 e o iniciador reverso de SEQ ID NO: 2.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica como aqui descrito, em que a sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 13, com todos os números inteiros neste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 13, com todos os números inteiros neste intervalo estando também aqui compreendidos particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 13, ou um fragmento do mesmo, e em que a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou seus fragmentos medeia a transcrição de uma molécula polinucleotídeo operavelmente associada, particularmente de um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associado de modo que o referido polinucleotídeo de interesse seja transcrito na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica como aqui descrito, em que a fita complementar da sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição é capaz de hibridizar com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 13, particularmente sob condições de hibridização moderadas, mais particularmente sob condições de hibridização rigorosas, e em que a sequência de nucleotídeos reguladora aqui referida medeia a transcrição de uma molécula de polinucleotídeos operavelmente associada, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associado, de modo que o referido polinucleotídeo de interesse seja transcrito na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do

pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica como aqui descrito, em que a sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição é a sequência descrita na SEQ ID NO: 13 ou um fragmento do mesmo, que ainda exibe uma funcionalidade completa como sequência de iniciação da transcrição.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica de acordo com a invenção e como aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou uma cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de terminação da transcrição obtenível a partir de um gene codificando um fator de despolimerização de actina 3 (ABP3), cuja sequência reguladora medeia a transcrição de uma molécula de polinucleotídeos operavelmente associada, particularmente de uma molécula de polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associada de modo que o referido polinucleotídeo de interesse seja transcrito na maior parte dos tecidos da planta excluindo os tecidos do pólen, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, particularmente a partir de um gene de fator de despolimerização de actina 3 (ABP3) de milho, em que

i) a referida sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de terminação da transcrição que tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos des-

crita na SEQ ID NO: 14; ou um fragmento do mesmo, que exibe ainda a funcionalidade de uma sequência de terminação; ou

ii) a fita complementar da referida sequência de nucleotídeos reguladora hibridiza com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 14, particularmente sob condições moderadas de hibridização, mais particularmente condições moderadas-rigorosas de hibridização, particularmente sob condições rigorosas de hibridização e medeia a terminação da transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associado; ou,

iii) a referida sequência de nucleotídeos reguladora tem uma sequência como descrito na SEQ ID NO: 14, incluindo seus complementos.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação e uma função de terminação da transcrição, respectivamente, cuja sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um gene codificando um fator de despolimerização de actina 3 (ABP3), que é expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, particularmente a partir de um gene de fator de despolimerização de actina 3 (ABP3) de milho, e cuja sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de iniciação da transcrição e uma sequência de terminação da transcrição, respectivamente, que têm pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou

99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente, ou um fragmento do mesmo que ainda exibe a funcionalidade completa como uma sequência de iniciação e de terminação da transcrição, respectivamente.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica, de acordo com a invenção e conforme aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação e uma função de terminação da transcrição, respectivamente, cuja sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um gene codificando um fator de despolimerização de actina 3 (ABP3), que é expressado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, particularmente a partir de um gene de fator de despolimerização de actina 3 (ABP3) do milho, e cuja sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de iniciação da transcrição como descrito na SEQ ID NO: 13 e uma sequência de terminação da transcrição como descrito na SEQ ID NO: 14.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e conforme aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou uma cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeos, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação e uma função de terminação da transcrição, respectivamente, cuja sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um gene representado por uma sonda de DNA, particularmente uma sonda de DNA exibindo uma sequência de DNA como descrito nas SEQ ID NOs: 47 até 56, cuja sonda de DNA apresenta

um padrão de sinal em amostras de tecidos, que é indicativo da expressão do referido gene em todos os tecidos e nenhuma ou substancialmente nenhuma expressão no pólen.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma planta transgênica conforme aqui descrito, em que o construto de polinucleotídeo quimérico, particularmente o construto de DNA quimérico, compreende um polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, operavelmente associado a e/ou sob controle operacional de uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição e é obtenível a partir do DNA genômico da planta, particularmente a partir do DNA genômico de milho, cujo polipeptídeo ou proteína é expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma planta transgênica como aqui descrito, em que o construto de polinucleotídeo quimérico, particularmente o construto de DNA quimérico, compreende um polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, operavelmente associado a e/ou sob controle operacional de uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição e é obtenível a partir de um gene representado por uma sonda de DNA, particularmente uma sonda de DNA exibindo uma sequência de DNA como descrito nas SEQ ID NOs: 57 até 79, cuja sonda de DNA apresenta um padrão de sinal nas amostras de tecidos, que é indicativo da expressão do referido gene em todos os tecidos e de nenhuma ou substancialmente nenhuma expressão nos tecidos do pendão.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinu-

cleotídeos, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora como aqui descrito, cuja sequência reguladora pode ser obtida em uma reação de PCR a partir de um padrão de DNA genômico de *Zea mays* usando

i) um primeiro iniciador que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 19, particularmente o iniciador da SEQ ID NO: 19; ou

ii) um segundo iniciador que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 20, particularmente o iniciador reverso da SEQ ID NO: 20; ou

iii) um primeiro iniciador como um iniciador direto que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 19 e um segundo iniciador como um iniciador reverso o qual tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 20, particularmente o iniciador direto da SEQ ID NO: 19 e o iniciador reverso da SEQ ID NO: 20.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica como aqui descrito, em que a sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 35, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 35, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 35, ou um fragmento do mesmo, e em que a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um fragmento do mesmo medeia a transcrição de uma molécula de polinucleotídeo operavelmente associada, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado de modo que o referido polinucleotídeo de interesse seja transcrito na maior parte dos tecidos da planta mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica como aqui descrito, em que a fita complementar da sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição é capaz de hibridizar com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 35, particularmente sob condições moderadas de hibridização, mais particularmente sob condições rigorosas de hibridização e em que a referida sequência de nucleotídeos reguladora medeia a transcrição de uma molécula de polinucleotídeos operavelmente associada, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associado de modo que o referido polinucleotídeo de interesse seja transcrito na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica como aqui descrito, em que a sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição é a sequência descrita na SEQ ID NO: 35 ou um fragmento do mesmo, que ainda apresenta a funcionalidade completa como sequência de iniciação da transcrição.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um

construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte dela tem uma função de terminação da transcição obtenível a partir de um DNA genômico de planta, particularmente um DNA genômico de milho e medeia a transcrição de uma molécula de polinucleotídeos operavelmente associada, particularmente de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado de modo que o referido polinucleotídeo de interesse seja transcrito na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, em que

i) a referida sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de terminação da transcrição que tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 36; ou um fragmento do mesmo que ainda apresenta a funcionalidade completa como sequência de iniciação da transcrição; ou

ii) a fita complementar da referida sequência de nucleotídeos reguladora hibridiza com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 36, particularmente sob condições moderadas de hibridização, particularmente sob condições moderadas-rigorosas de hibridização, particularmente sob condições rigorosas de hibridização e medeia a terminação da transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado; ou

iii) a referida sequência reguladora tem uma sequência como descrito na SEQ ID NO: 36, ou um fragmento do mesmo, que ainda apresenta funcionalidade completa como sequência de iniciação da transcrição inclu-

indo seus complementos.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação e uma função de terminação da transcrição, respectivamente, cuja sequência de nucleotídeos reguladora é obteníveis a partir de DNA genômico de planta, particularmente a partir de DNA de milho genômico, que é expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, cuja sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de iniciação da transcrição e uma sequência de terminação da transcrição, respectivamente, sequências essas que têm pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO:36, respectivamente, incluindo um fragmento do mesmo, que ainda apresenta a funcionalidade completa como uma sequência de iniciação e como uma sequência de terminação da transcrição, respectivamente.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e conforme aqui descrito compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo

menos parte dela tem uma função de iniciação e uma função de terminação da transcrição, respectivamente, sequência de nucleotídeos reguladora essa que é obtenível a partir de um DNA de planta genômico, particularmente de um DNA de milho genômico e é expressa na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, sequência de nucleotídeos reguladora essa que compreende uma sequência de iniciação da transcrição como descrito na SEQ ID NO: 35 e uma sequência de terminação da transcrição como descrito na SEQ ID NO:36 respectivamente, incluindo um fragmento do mesmo, que ainda apresenta a funcionalidade completa como uma sequência de iniciação e como uma sequência de terminação da transcrição, respectivamente.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito, em que o polinucleotídeo de interesse codificando proteínas ou polipeptídeos codifica um produto polipeptídico apresentando atividade inseticida, particularmente uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis*.

Em uma modalidade, a concentração do produto polipeptídico expresso a partir do polinucleotídeo de interesse codificando proteínas nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão é tal que nenhuma atividade inseticida possa ser detectada em um ensaio de alimentação de inseto padrão. Em particular, a concentração do produto de expressão no pendão é abaixo de um nível básico não superior a 10 ng/mg de proteína solúvel, particularmente não superior a 5 ng/mg de proteína solúvel, mais particularmente não superior a 3 ng/mg de proteína solúvel, mas particularmente não superior a 2 ng/mg de proteína solúvel ou inferior.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica de acordo com a invenção e como aqui descrito, em que o polinucleotídeo de interesse codificando proteínas ou polipeptídeos codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando

também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO:15.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito, em que o polinucleotídeo de interesse codificando proteínas ou polipeptídeos codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem a sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 15.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica de acordo com a invenção e como aqui descrito, em que o polinucleotídeo de interesse codificando proteínas ou polipeptídeos codifica um produto polipeptídico contribuindo para o melhoramento da tolerância à seca, particularmente uma forma desregulada de uma H^+-pirofosfatase, em que o referido polipeptídeo ou proteína está sob controle de uma sequência reguladora de acordo com a invenção em pelo menos parte dela tem uma função de iniciação da transcrição que medeia a expressão de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente expressão nos tecidos do pólen e/ou dos tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito é uma planta de *Zea mays*.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora, em que pelo menos parte dela tem uma função de iniciação da transcrição que medeia a expressão de uma proteína operavelmente associada codificando um polinucleotídeo de inte-

resse na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras masculinas, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade da invenção, a sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um gene representado por uma sonda de DNA, particularmente uma sonda de DNA exibindo uma sequência de DNA como descrito nas SEQ ID NOs: 47 até 56, sonda de DNA essa que apresenta um padrão de sinal em amostras de tecido que é indicativo da expressão do referido gene em todos os tecidos e nenhuma ou substancialmente nenhuma expressão no pólen.

Em uma modalidade da invenção, a sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um gene codificando um fator de despolimerização de actina 3, que é expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, particularmente um gene do fator de despolimerização de actina 3 do milho.

Em uma modalidade da invenção, a sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um gene representado por uma sonda de DNA, particularmente uma sonda de DNA exibindo uma sequência de DNA como descrito nas SEQ ID NOs: 57 até 79, sonda de DNA essa que apresenta um padrão de sinal nas amostras de tecido, que é indicativo da expressão do referido gene em todos os tecidos e nenhuma ou substancialmente nenhuma expressão nos tecidos do pendão...

Em uma modalidade, a invenção fornece uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora como aqui descrito, sequência essa que é obtenível a partir de um padrão de DNA genômico de *Zea mays* usando

i) um primeiro iniciador que tem pelo menos 90%, particular-

mente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 1, particularmente um primeiro iniciador da SEQ ID NO: 1; ou

ii) um segundo iniciador que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 2, particularmente um segundo iniciador da; SEQ ID NO: 2; ou

iii) um primeiro iniciador como um iniciador direto que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 1 e um segundo iniciador como um iniciador reverso que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 2, particularmente o iniciador direto da SEQ ID NO: 1 e o iniciador reverso da SEQ ID NO: 2.

Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos reguladora de acordo com a invenção e como aqui descrito é modificada usando um ou mais oligonucleotídeos selecionados a partir do grupo de oligonucleotídeos descrito nas SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora como aqui descrito, sequência de nucleotídeos reguladora essa que fornece uma função de iniciação da transcrição, em que a sequência de nucleotídeos fornecendo essa função têm pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendi-

dos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 13 e em que a referida sequência de nucleotídeos reguladora medeia a transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora como aqui descrita, sequência de nucleotídeos reguladora essa que fornece uma função de iniciação da transcrição, em que a fita complementar da sequência de nucleotídeos fornecendo a referida função hibridiza com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 13, particularmente sob condições moderadas de hibridização, mais particularmente sob condições moderadamente rigorosas de hibridização e em que a referida sequência de nucleotídeos reguladora medeia a transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa. Em particular, a referida hbridização ocorre sob condições rigorosas de hibridização.

Em uma modalidade da invenção, a sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição é a sequência descrita na SEQ ID NO: 13, ou um fragmento do mesmo que ainda apresenta funcionalidade completa como uma sequência de iniciação da transcrição, e seus complementos.

Em uma modalidade, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora de acordo com a invenção e como aqui descrito, compreendendo aproximadamente 1 kb da sequência de nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição ZmABP3 de um gene ZmABP3, particularmente a montante do sítio de início da transcrição ZmABP3 do gene ZmABP3 como descrito na SEQ ID NO: 17.

Em uma modalidade da invenção, a referida sequência de nucleotídeos reguladora compreende adicionalmente a sequência ZmABP3 5' não traduzida, o primeiro éxon ZmABP3, o primeiro íntron ZmABP3 e uma porção do segundo éxon ZmABP3, particularmente uma porção do segundo éxon ZmABP3 terminando no códon de iniciação da tradução, particularmente uma porção do segundo éxon ZmABP3 compreendendo entre cerca de 10 até cerca de 20 nucleotídeos, particularmente entre cerca de 12 e cerca de 16 nucleotídeos, particularmente cerca de 14 nucleotídeos, do segundo éxon.

Em uma modalidade, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de terminação da transcrição, cuja sequência é obtenível em uma reação de ampliação de PCR a partir de um padrão de gDNA, particularmente um padrão de gDNA de milho, usando um iniciador direto (P3 (5'-tatatagagctcgcatcatgatcatgcatcatggact-3') o qual tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 9 e um iniciador reverso (P4 (5'-atatatactagtggcgcgccacactttctgtcgcatgtgatttgca-3') o qual tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo

menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 10. Em especial, a referida sequência de nucleotídeos reguladora compreende um terminador transcricional e um sinal de poliadenilação. Em especial, é usado um iniciador direto (P3 (5'-tatatagagctcgcatcatgatcatgcatcatggact-3')) o qual tem uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 9 e um iniciador reverso (P4 (5'-atatatactagtggcgcgccacactttctgtcgcatgtgatttgca-3') o qual tem uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 10.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora a qual compreende uma sequência de terminação da transcrição obtenível a partir de um gene codificando um fator de despolimerização de actina 3 (ABP3), cuja sequência reguladora medeia a transcrição de uma molécula de polinucleotídeo operavelmente associada, particularmente de uma molécula de polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associada, de modo que o referido polinucleotídeo de interesse seja transcrito na maior parte dos tecidos da planta mas não ou substancialmente não transcrito nos tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, particularmente a partir de um gene de fator de despolimerização de actina 3 (ABP3) de milho, em que

i) a referida sequência de nucleotídeos reguladora compreende de uma sequência de terminação da transcrição, cuja sequência reguladora tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 14; ou

ii) a fita complementar da referida sequência de nucleotídeos reguladora hibridiza com a sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 14, particularmente sob condições moderadas de hibridização, mais particularmente condições moderadas-rigorosas de hibridização, particularmente sob condições rigorosas de hibridização e medeia a terminação da transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado; ou

iii) a referida sequência de nucleotídeos reguladora tem uma sequência como descrito na SEQ ID NO: 14, ou um fragmento do mesmo que ainda exibe funcionalidade completa como uma sequência de terminação, incluindo complementos do mesmo.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação e uma função de terminação da transcrição, respectivamente, cuja sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um gene codificando um fator de despolimerização de actina 3 (ABP3), que é expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas não ou substancialmente não é express é expresso nos tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, particularmente a partir de um gene de fator de despolimerização de actina 3 (ABP3) de milho, e cuja sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de iniciação da transcrição como descrito na SEQ ID NO: 13 e uma sequência de terminação da transcrição como descrito na SEQ ID NO:14.

Em uma modalidade da invenção, a sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de DNA genômico de milho, particularmente a partir de um gene putativo no genoma de milho, que é altamente expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas não ou substancialmente não é expresso nos tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expres-

são esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora de acordo com a invenção e como aqui descrito compreendendo aproximadamente 2,6 kb da sequência 5' incluindo aproximadamente 2 kb da sequência 5'-não-transcrita, da 5'-UTR, e éxon 1 e parte do éxon 2 e íntron 1, particularmente aproximadamente 0,6 kb representando o éxon 1, íntron 1 e cerca de 16 pb de éxon 2.

Em uma modalidade, a invenção fornece uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição como aqui descrito, sequência reguladora essa que é obtenível a partir de um padrão de DNA genômico de *Zea mays* usando

i) um primeiro iniciador que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 19, particularmente o iniciador da SEQ ID NO: 19; ou

ii) um segundo iniciador que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 20, particularmente o iniciador reverso da SEQ ID NO: 20; ou

iii) um primeiro iniciador como um iniciador direto que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 19 e um

segundo iniciador como um iniciador reverso o qual tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 20, particularmente o iniciador direto da SEQ ID NO: 19 e o iniciador reverso da SEQ ID NO: 20.

Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito é modificada usando um ou mais oligonucleotídeos selecionados a partir do grupo de oligonucleotídeos descritos nas SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 e SEQ ID NO: 26.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora como aqui descrito, sequência de nucleotídeos reguladora essa que fornece uma função de iniciação da transcrição, em que a sequência de nucleotídeos fornecendo a referida função tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 35 e em que a referida sequência de nucleotídeos reguladora medeia a transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinu-

cleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora como aqui descrito, cuja sequência de nucleotídeos reguladora fornece uma função de iniciação da transcrição, em que a fita complementar da sequência de nucleotídeos fornecendo a referida função hibridiza com a sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 35, particularmente sob condições moderadas de hibridização, mais particularmente sob condições de hibridização moderadamente rigorosas e em que a referida sequência de nucleotídeos reguladora medeia a transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando a proteína operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa. Em especial, a referida hibridização ocorre sob condições de hibridização rigorosas.

Em uma modalidade da invenção, a sequência de nucleotídeos fornecendo a função de iniciação da transcrição é a sequência descrita na SEQ ID NO: 35, ou um fragmento do mesmo, que ainda exibe a funcionalidade completa tal como uma sequência de iniciação da transcrição e complementos do mesmo.

Em uma modalidade, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de terminação da transcrição, cuja sequência é obtenível em uma reação de amplificação de PCR a partir de um padrão de gDNA, particularmente um padrão de gDNA de milho, usando um iniciador direto que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 29 e um iniciador reverso, que tem pelo menos 90%, particularmente pelo menos 91%, particularmente pelo menos 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotí-

deos como descrito na SEQ ID NO: 30. Em particular, a referida sequência de nucleotídeos reguladora compreende um terminador transcricional e um sinal de poliadenilação. Em particular, são usados um iniciador direto, o qual tem uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 29 e um iniciador reverso, o qual tem uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 30.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora em que

i) a referida sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de terminação da transcrição a qual tem pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 36; ou

ii) a fita complementar da referida sequência de nucleotídeos reguladora hibridiza com uma sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO: 36, particularmente sob condições moderadas de hibridização, particularmente sob condições moderadas-rigorosas de hibridização, particularmente sob condições rigorosas de hibridização e medeia a terminação da transcrição de um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associado; ou

iii) a referida sequência reguladora tem uma sequência como descrito na SEQ ID NO: 36, ou um fragmento do mesmo, que ainda exibe a funcionalidade completa como uma sequência de terminação, incluindo complementos das mesmas.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma sequência de

nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação e a função de terminação da transcrição, respectivamente, cuja sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um DNA genômico de milho, a qual é expressa na maior parte dos tecidos da planta, mas não ou substancialmente não é expressa nos tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, e essa sequência de nucleotídeos reguladora compreende uma sequência de iniciação da transcrição e uma sequência de terminação da transcrição, respectivamente, que têm pelo menos entre 80% e 85% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos entre 85% e 90% de identidade de sequência, com todos os números inteiros dentro deste intervalo estando também aqui compreendidos, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos descrita nas SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO:36, respectivamente.

Em uma modalidade da invenção, é fornecida uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação e a função de terminação da transcrição, respectivamente, essa sequência de nucleotídeos reguladora é obtenível a partir de um DNA genômico de milho, que é expressa na maior parte dos tecidos da planta, mas não ou substancialmente não é expressa nos tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, e que a sequência de nucleotídeos reguladora compreenda uma sequência de iniciação da transcrição como descrito na SEQ ID NO: 35 e uma sequência de terminação da transcrição

como descrito na SEQ ID NO: 36.

É evidente para o versado na técnica que, com base na sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36, os fragmentos de vários comprimentos possam ser obtidos a partir das referidas sequências, por exemplo usando quaisquer combinações de iniciadores de interesse para gerar fragmentos que ainda exibem a função específica reguladora de acordo com a invenção que é dirigir a expressão de um polinucleotídeo de interesse operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta excepto nos tecidos do pólen e do pendão, respectivamente. A invenção inclui assim fragmentos derivados de um promotor da transcrição de comprimento completo e um terminador de comprimento completo da invenção e como aqui descrito, respectivamente que funcionam de acordo com a invenção, isto é, são capazes de conferir expressão e terminação de uma sequência de nucleotídeos operavelmente associada na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa e/ou no pendão.

A função dos fragmentos promotor e terminador, uma vez obtida, pode ser facilmente testada fundindo-os a um gene marcador selecionável ou rastreável e ensaiando os construtos da fusão quanto à retenção da atividade do promotor específico. Esses ensaios estão no âmbito do conhecimento comum de uma pessoa versada na técnica.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com fragmentos de nucleotídeos, particularmente com fragmentos de nucleotídeos obteníveis a partir de sequências reguladoras de um gene de fator de despolimerização de actina 3 (ABP3), cujos fragmentos de nucleotídeo são de pelo menos cerca de 50 bases, preferencialmente de entre cerca de 400 bases e cerca de 650 bases, mais preferencialmente de entre cerca de 200 bases e cerca de 400 bases e o mais preferencialmente de cerca de 350 bases de comprimento e que ainda exibem a função reguladora específica, de acordo com a invenção, que é dirigir a expressão de um polinucleotídeo de interesse operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo

essencialmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com fragmento de nucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma extensão consecutiva de pelo menos 50 nt, particularmente de entre cerca de 400 nt e cerca de 650 nt, particularmente de entre cerca de 200 nt e cerca de 400 nt, particularmente de cerca de 350 nt em comprimento da sequência de nucleotídeos descrita na SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO: 35, respectivamente, em que as referidas sequências de nucleotídeos ainda exibem a função reguladora específica, de acordo com a invenção, que é conduzir a expressão de um polinucleotídeo de interesse operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

É também claro para o técnico versado que sequências variáveis possam ser obtidas sem afetar as propriedades específicas das sequências reguladoras, de acordo com a invenção, através da introdução de mutações, isto é, inserções, deleções e/ou substituições de um ou mais nucleotídeos, nas sequências de DNA das SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36, respectivamente, usando métodos conhecidos na técnica. Adicionalmente, uma sequência de nucleotídeos não modificada ou modificada da presente invenção pode ainda ser modificada através de embaralhamento da sequência da invenção. Para testar uma função das sequências de DNA variáveis, de acordo com a invenção, a sequência de interesse é operavelmente ligada a um gene marcador selecionável ou rastreável e a expressão do gene marcador é testada em ensaios de expressão transiente com protoplastos ou em todos tecidos da planta completa ou em plantas estavelmente transformadas. É conhecido de um técnico versado que as sequências de DNA capazes de dirigir a expressão de uma sequência de nucleotídeos operavelmente associada são construídas de modo modular. Consequentemente, os níveis de expressão dos fragmentos mais curtos de

DNA podem ser diferentes dos do fragmento mais longo e podem ser diferentes uns dos outros. Por exemplo, a deleção de um elemento a montante de regulação descendente vai conduzir a um aumento nos níveis de expressão da sequência de nucleotídeos associada enquanto que a deleção de um elemento regulação ascendente vai baixar os níveis de expressão da sequência de nucleotídeos associada.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com um cassete de expressão compreendendo uma sequência de nucleotídeos reguladora ou um cassete de expressão compreendendo a referida sequência de nucleotídeos reguladora ou um construto de polinucleotídeo, particularmente um construto de polinucleotídeo quimérico, compreendendo a referida sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

Em uma modalidade, o cassete de expressão, de acordo com a invenção, compreende cerca de 2,3 kb da sequência 5' de ZmABP3 que consiste em cerca de 1,1 kb da sequência 5' não-transcrita, cerca de 0,25 kb de 5'-UTR e cerca de 0,98 kb representando íntron 1 ZmABP3, cerca de 1,013 kb da sequência 3' que começa logo a seguir ao códon de paragem da tradução de ABP3 incluindo cerca de 0,3 kb de 3'-UTR e cerca de 0,7 kb da sequência não transcrita, a qual funciona como o terminador transcricional e sinal de poliadenilação.

Em uma modalidade, é fornecido um cassete de expressão, de acordo com a invenção, em que o códon de iniciação da tradução natural é silenciado e movido para o segundo éxon, particularmente movido em até 15 nucleotídeos da extremidade 5' do éxon 2 de ZmABP3.

Em uma modalidade, é fornecido um cassete de expressão, de acordo com a invenção, em que o códon de iniciação é precedido pela sequência Kozak 5'-...CCACC...-3'.

Em uma modalidade, o cassete de expressão, de acordo com a invenção, compreende uma sequência de nucleotídeos reguladora compreendendo aproximadamente 2,6 kb da sequência 5', que consiste em aproximadamente 2 kb da sequência 5' não transcrita, e cerca de 12 pb de 5'-UTR, aproximadamente 0,6 kb representando o éxon 1, íntron 1 e cerca de 16 pb

de éxon 2; e aproximadamente 1 kb da sequência 3' que começa logo a seguir ao códon de terminação da tradução e inclui aproximadamente 0,6 kb de 3'-UTR e cerca de 0,4 kb da sequência não transcrita, e funciona como terminador transcricional e sinal de poliadenilação.

Em uma modalidade, é fornecido um cassete de expressão, de acordo com a invenção, em que o códon de iniciação da tradução natural é silenciado e movido para o segundo éxon.

Em uma modalidade, é fornecida uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo ou uma proteína que codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem pelo menos 80% de identidade de sequência, particularmente pelo menos 85% de identidade de sequência, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 15.

Em uma modalidade, é fornecida uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo ou uma proteína que codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 15.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com uma planta transgênica compreendendo um cassete de expressão de acordo com a invenção e como aqui descrita.

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma planta transgênica, particularmente uma planta transgênica de milho compreendendo a sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

Em uma modalidade, a invenção fornece uma planta transgênica, particularmente uma planta transgênica de milho compreendendo uma sequência reguladora de acordo com a invenção e como aqui descrito em associação com um polinucleotídeo de interesse, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína.

Em uma modalidade, a invenção fornece uma planta transgênica, particularmente uma planta transgênica de milho compreendendo um cassete de expressão, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito, em que a sequência de nucleotídeos codificando polipeptídeo ou proteína codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem pelo menos 80% de identidade de sequência, particularmente pelo menos 85% de identidade de sequência, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO:15 e está sob o controle de sequências reguladoras operáveis na referida planta.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito, em que a sequência de nucleotídeos codificando polipeptídeo ou proteína codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO: 15 e está sob o controle de sequências reguladoras operáveis na referida planta.

A invenção fornece também métodos para preparar cassetes de expressão compreendendo a sequência reguladora, de acordo com a invenção, compreendendo ligar um polinucleotídeo expressável codificando um polipeptídeo ou uma proteína de interesse com a sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito para obter um construto de expressão, em que o polinucleotídeo de interesse é operavelmente ligado ou associado à sequência reguladora, de modo que a expressão do polipeptídeo ou da proteína de interesse é mediada pela sequência reguladora de acordo com a invenção e resulta na expressão do referido polipeptídeo ou da proteína de interesse essencialmente em todos os tecidos da planta, mas exclui essencialmente a expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com um método para produzir uma planta transgênica expressando uma sequência de DNA de interesse em um tecido que não de pólen, mas sem ou substancialmente

sem expressão nos tecidos do pólen e/ou do pendão, compreendendo

a. transformar um cassete de expressão, de acordo com a invenção, e como aqui descrito em uma célula vegetal a qual compreende uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição que medeia a expressão de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa; e

b. regenerar a célula vegetal transformada na etapa a) em uma planta.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com um método de controle de pragas alvo de insetos que se alimentam nos tecidos vegetativos da planta tais como a folha, o caule e a raiz e/ou nos tecidos reprodutores tais como a espiga, mas protegendo as pragas não-alvo que se alimentam de pólen compreendendo

a. crescer uma planta, de acordo com a invenção, e como aqui descrito em uma área que está infestada com a praga-alvo;

b. expressar um polipeptídeo ou uma proteína que é capaz de controlar a referida praga-alvo sob o controle de uma sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com um método para proteger os tecidos reprodutores de uma planta, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão contra danos causados pela expressão nos referidos tecidos de um polipeptídeo ou proteína de interesse compreendendo

a. crescer uma planta de acordo com a invenção e como aqui descrito;

b. expressar na referida planta um polipeptídeo ou uma proteína de interesse sob o controle da uma sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

Em uma modalidade, a presente invenção se relaciona com o

uso de uma sequência reguladora, de acordo com a presente invenção, e como aqui descrito para proteger os tecidos reprodutores de uma planta, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão contra danos causados pela expressão nos referidos tecidos de um polipeptídeo ou proteína de interesse compreendendo expressar na referida planta o referido polipeptídeo ou proteína de interesse sob o controle de uma sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO: 1 representa a sequência de nucleotídeos do iniciador direto P1

SEQ ID NO: 2 representa a sequência de nucleotídeos de iniciador reverso P2

SEQ ID NO: 3 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo Patg

SEQ ID NO: 4 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo Pnco

SEQ ID NO: 5 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo ADPc-1

SEQ ID NO: 6 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo ADPc-2

SEQ ID NO: 7 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo ADPc-4

SEQ ID NO: 8 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo adp3-a

SEQ ID NO: 9 representa a sequência de nucleotídeos de iniciador direto P3

SEQ ID NO: 10 representa a sequência de nucleotídeos do iniciador reverso P4

SEQ ID NO: 11 representa a sequência de nucleotídeos de iniciador direto Tnco

SEQ ID NO: 12 representa a sequência de nucleotídeos de iniciador direto T2

SEQ ID NO: 13 representa a sequência de nucleotídeos de sequência reguladora *Zm*ABP3 modificada incluindo a sequência de iniciação da transcrição

SEQ ID NO: 14 representa a sequência de nucleotídeos de sequência terminal *Zm*ABP3

SEQ ID NO: 15 representa a sequência de nucleotídeos de Cry1AbG6

SEQ ID NO: 16 representa a sequência de nucleotídeos de sequência codificando AtAVP1D otimizada de milho

SEQ ID NO: 17 representa a sequência de nucleotídeos do gene ZmABP3

SEQ ID NO: 18 representa a sequência de nucleotídeos do plasmídeo pNOV1321

SEQ ID NO: 19 representa a sequência de nucleotídeos de iniciador direto ABT P1 forw

SEQ ID NO: 20 representa a sequência de nucleotídeos do iniciador reverso ABT P2 rev

SEQ ID NO: 21 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo pABT mut1

SEQ ID NO: 22 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo pABT mut2

SEQ ID NO: 23 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo pABT mut3

SEQ ID NO: 24 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo pABT mut4

SEQ ID NO: 25 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo pABT mut5

SEQ ID NO: 26 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo pABT mut6

SEQ ID NO: 27 representa a sequência de nucleotídeos de iniciador direto pABT amp1

SEQ ID NO: 28 representa a sequência de nucleotídeos do iniciador reverso pABT amp2

SEQ ID NO: 29 representa a sequência de nucleotídeos de iniciador direto ABT P4

SEQ ID NO: 30 representa a sequência de nucleotídeos do iniciador reverso ABT P5

SEQ ID NO: 31 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo ABTt m1

SEQ ID NO: 32 representa a sequência de nucleotídeos de oligonucleotídeo ABTt m2

SEQ ID NO: 33 representa a sequência de nucleotídeos de ZmABT1 cDNA

SEQ ID NO: 34 representa a sequência de nucleotídeos de ZmABT2 cDNA

SEQ ID NO: 35 representa a sequência de nucleotídeos do promotor ZmABT

SEQ ID NO: 36 representa a sequência de nucleotídeos da sequência terminal ZmABT.

SEQ ID NO: 37 representa a sequência de nucleotídeos do construto de montagem ZmABP3-Cry1AbG6.

SEQ ID NO: 38 representa a sequência de nucleotídeos do construto binário ZmABP3-Cry1AbG6.

SEQ ID NO: 39 representa a sequência de nucleotídeos do construto binário ZmABP3-Cry1AbG6 melhorada.

SEQ ID NO: 40 representa a sequência de nucleotídeos do construto de montagem ZmABP3-AmCyan.

SEQ ID NO: 41 representa a sequência de nucleotídeos do construto binário ZmABP3-AmCyan.

SEQ ID NO: 42 representa a sequência de nucleotídeos do construto de montagem ZmABP3-AtAVP1D.

SEQ ID NO: 43 representa a sequência de nucleotídeos de construção binário ZmABP3-AtAVP1D.

SEQ ID NO: 44 representa a sequência de nucleotídeos de plasmídeo 15772 (Montagem ZmABT)

SEQ ID NO: 45 representa a sequência de nucleotídeos de plasmídeo 15773

SEQ ID NO: 46 representa a sequência de nucleotídeos de ZmABT gDNA

SEQ ID NO: 47 representa a sequência de nucleotídeos de Ctrl_ZMU45855-3_at

SEQ ID NO: 48 representa a sequência de nucleotídeos de AF032370_at

SEQ ID NO: 49 representa a sequência de nucleotídeos de Zm001747_s_at

SEQ ID NO: 50 representa a sequência de nucleotídeos de Zm005803_s_at

SEQ ID NO: 51 representa a sequência de nucleotídeos de Zm007728_s_at

SEQ ID NO: 52 representa a sequência de nucleotídeos de Zm009722_s_at

SEQ ID NO: 53 representa a sequência de nucleotídeos de Zm015335_s_at

SEQ ID NO: 54 representa a sequência de nucleotídeos de Zm021004_s_at

SEQ ID NO: 55 representa a sequência de nucleotídeos de Zm058948_s_at

SEQ ID NO: 56 representa a sequência de nucleotídeos de Zm061393_s_at

SEQ ID NO: 57 representa a sequência de nucleotídeos de Zm016864_s_at

SEQ ID NO: 58 representa a sequência de nucleotídeos de Zm018791_at

SEQ ID NO: 59 representa a sequência de nucleotídeos de ZMMETALL_x_at
SEQ ID NO: 60 representa a sequência de nucleotídeos de Zm000019_at
SEQ ID NO: 61 representa a sequência de nucleotídeos de Zm002987_at
SEQ ID NO: 62 representa a sequência de nucleotídeos de Zm002990_s_at
SEQ ID NO: 63 representa a sequência de nucleotídeos de Zm002990_x_at
SEQ ID NO: 64 representa a sequência de nucleotídeos de Zm004433_at
SEQ ID NO: 65 representa a sequência de nucleotídeos de Zm005761_at
SEQ ID NO: 66 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm006285_at
SEQ ID NO: 67 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm006481_s_at
SEQ ID NO: 68 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm010323_s_at
SEQ ID NO: 69 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm011554_at
SEQ ID NO: 70 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm011554_x_at
SEQ ID NO: 71 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm021403_at
SEQ ID NO: 72 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm028405_s_at
SEQ ID NO: 73 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm032921_s_at
SEQ ID NO: 74 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm033444_s_at
SEQ ID NO: 75 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm035082_s_at
SEQ ID NO: 76 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm040564_x_at
SEQ ID NO: 77 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm054116_s_at
SEQ ID NO: 78 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm066342_at
SEQ ID NO: 79 descreve a sequência de nucleotídeos de Zm051284_at
SEQ ID NO: 80 descreve a sequência de nucleotídeos de Vetor 15289
SEQ ID NO: 81 descreve a sequência de nucleotídeos de ZmABP-948-binário
SEQ ID NO: 82 descreve a sequência de nucleotídeos de ZmABT-990-binário
SEQ ID NO: 83 descreve a sequência de nucleotídeos de iniciador 5’ Bfr1
SEQ ID NO: 84 descreve a sequência de nucleotídeos de iniciador 3’ Xba1
SEQ ID NO: 85 descreve a sequência de nucleotídeos de iniciador 5’Gfix
SEQ ID NO: 86 descreve a sequência de nucleotídeos de iniciador 3’Gfix
SEQ ID NO: 87 descreve a sequência de nucleotídeos de iniciador 5’1Ab5XbaI
SEQ ID NO: 88 descreve a sequência de nucleotídeos de iniciador 3’1Ab3d6
SEQ ID NO: 89 descreve a sequência de nucleotídeos de cy2’
SEQ ID NO: 90 descreve a sequência de nucleotídeos de cy1

SEQ ID NO: 91 descreve a sequência de nucleotídeos de cy2

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

As expressões e termos técnicos usados no escopo deste pedido são geralmente para darem o significado que comumente é aplicado na técnica relativa à biologia molecular de plantas se não se indicar de outro modo aqui a seguir.

Como usado nesta especificação e nas reivindicações juntas, as formas singulares "um", "uma", e "o" incluem os plurais referentes a menos que o contexto claramente determine de outro modo. Assim, por exemplo, a referência a "uma planta" inclui uma ou mais plantas, e a referência a "uma célula" inclui misturas de células, tecidos, e similares.

Como usado nesta especificação e nas reivindicações juntas, a forma plural "tecidos", inclui também a forma singular a menos que o contexto claramente determine de outro modo. Assim, por exemplo, a referência a "tecidos do pendão" inclui um ou mais tecidos presentes no pendão.

Como usado nesta especificação e nas reivindicações juntas, a frase "a maior parte dos tecidos da planta" ou "essencialmente todos os tecidos da planta" é usada intercambiavelmente e se refere à maior parte dos tecidos presentes na planta com a exceção dos tecidos das estruturas reprodutoras, particularmente os tecidos do pólen e do pendão. Em particular, "a maior parte dos tecidos" se refere àqueles tecidos da planta onde os insetos-alvo se alimentam principalmente, com a exceção dos tecidos das estruturas reprodutoras masculinas, tais como os tecidos do caule, das raízes, das folhas, da espiga, da bainha da espiga, as sedas e os núcleos de desenvolvimento.

O termo "polinucleotídeo" é aqui entendido para se referir à molécula polimérica de elevado peso molecular, a qual pode ser de fita simples ou fita dupla, composta de monômeros (nucleotídeos) contendo um açúcar, fosfato e uma base que é purina ou pirimidina. Um "fragmento de polinucleotídeo" é uma fração de uma dada molécula de polinucleotídeo. Nas plantas superiores, o ácido desoxirribonucleico (DNA) é o material genético enquanto que o ácido ribonucleico (RNA) está envolvido na transferência de infor-

mação contida no DNA nas proteínas. Um "genoma" é o corpo completo do material genético contido em cada célula de um organismo, incluindo os genomas das mitocôndrias e dos plastídeos. O termo "polinucleotídeo" se refere, portanto, a um polímero de DNA ou RNA o qual pode ser de fita simples ou dupla, contendo opcionalmente bases de nucleotídeo sintéticas, não naturais ou alteradas capazes de incorporação nos polímeros de DNA ou RNA. A menos que indicado de outro modo, uma sequência particular de ácido nucleico desta invenção implicitamente também inclui as suas variantes conservativamente modificadas (por exemplo, substituições de códon degenerado) e sequências complementares e assim como sequência explicitamente indicada. Especificamente, substituições de códon degenerado podem ser obtidas através da formação de sequências, nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída por resíduos de base mista e/ou desóxi-inosina (Batzer, et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka, et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); e Rossolini, et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). O termo polinucleotídeo é usado alternativamente com ácido nucleico, sequência de nucleotídeos e pode incluir genes, cDNAs, e mRNAs codificados por um gene, etc.

Uma "sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição", é aqui entendida para se referir a uma sequência de nucleotídeos, que controla a expressão de uma sequência codificadora operavelmente associada, fornecendo o reconhecimento para a RNA polimerase e outros fatores necessários para a transcrição correta e está localizada geralmente a montante (5') da sua sequência codificadora. "Sequências de nucleotídeo reguladoras" incluem elementos de sequências reguladoras 5' localizadas proximalmente ou mais distalmente a montante da região de codificação associada, que influencia a transcrição, o processamento ou a estabilidade do RNA, ou a tradução da sequência codificadora associada. "Sequências de nucleotídeo reguladoras" podem incluir ainda sequências 3', incluindo sequências 3' não traduzidas e/ou 3' não transcritas localizadas a jusante da região de codificação associada, e podem incluir um sítio de terminação da transcrição.

"Sequências de nucleotídeo reguladoras" podem incluir intensificadores, promotores sequências líder não traduzidas, , íntrons, e sequências de sinal de poliadenilação. Incluem sequências naturais e sintéticas assim como sequências que podem ser uma combinação de sequências sintéticas e naturais. Um "intensificador" é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade promotora e pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível ou a especificidade para um tecido de um promotor. É capaz de operar em ambas as orientações (normal ou invertida), e é capaz de funcionar mesmo quando mudada para montante ou para jusante do promotor. O significado do termo "sequências de nucleotídeo reguladoras" inclui sequências de "iniciação da transcrição" ou "promotora" e "sequências reguladoras promotoras". Estes termos são usados intercambiavelmente de aqui em diante.

Para os fins desta invenção, a definição do termo "sequência 3' não transcrita" inclui modificações da sequência de nucleotídeos de uma sequência 3' não transcrita derivada de um gene-alvo, desde que a sequência 3' não transcrita modificada não reduza significativamente a atividade da sequência reguladora 3' associada. A sequência 3' não transcrita se estende aproximadamente 0,5 até 1,5 kb a jusante de um sítio de terminação da transcrição.

O polinucleotídeo da invenção é entendido para ser fornecido na forma isolada. O termo "isolado" significa que o polinucleotídeo aqui descrito e reivindicado não é um polinucleotídeo tal como ocorre no seu contexto natural, se ele realmente tiver uma contraparte de ocorrência natural. Assim sendo, os outros compostos da invenção descritos adicionalmente abaixo são entendidos para serem isolados. Se reivindicado no contexto de um genoma de planta, o polinucleotídeo da invenção se distingue das contrapartes de ocorrência natural pelas, isto é, modificações introduzidas na sequência de contraparte de ocorrência natural e/ou no lado da inserção no genoma e nas sequências que flanqueiam o lado da inserção.

"Operavelmente associado" e "operavelmente ligado" são usados intercambiavelmente e se referem à associação de sequências de ácido

nucleico em um único fragmento de ácido nucleico de modo que a função de um é afetada pelo outro. Por exemplo, um promotor está associado ou operavelmente ligado com uma sequência codificadora ou RNA funcional quando é capaz de afetar a expressão da sequência codificadora ou do RNA funcional (isto é, que a sequência codificadora ou o RNA funcional está sob controle transcricional do promotor). Sequências codificadoras orientadas no senso ou no antissenso podem estar operavelmente ligadas a sequências reguladoras.

O termo "presente de forma significativa" como aqui usado no contexto da presente invenção se refere ao fato que só ocorre no pólen uma expressão negligenciável resultando somente em quantidades mínimas do produto de expressão no tecido do pólen em concentrações que podem ser detectáveis por métodos de detecção de alta resolução tais como HPLC, ensaios à base de ELISA, análise Western, ensaios de alimentação de insetos, ensaios de atividade enzimática, etc., mas ficam em um determinado limiar que é o necessário para afetar a função biológica pretendida do produto de expressão. Por exemplo, no caso da endotoxina Cry1AbG6 de *Bacillus thuringiensis,* o limiar é um intervalo entre 5 ng/mg de proteína solúvel e 60 ng/mg de proteína solúvel, particularmente em um intervalo entre 20 ng/mg de proteína solúvel e 50 ng/mg de proteína solúvel.

O termo "gene quimérico" refere-se a qualquer gene que contenha 1) sequências de DNA, incluindo sequências reguladoras e codificadoras que não são encontradas juntas na natureza nesta combinação específica ou 2) sequências codificando partes de proteínas naturalmente não adjacentes, ou 3) partes de promotores que não são naturalmente adjacentes. Deste modo, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências codificadoras que derivam de origens diferentes, ou compreender sequências reguladoras e sequências codificadoras derivadas da mesma origem, mas arranjadas em um modo diferente daquele encontrado na natureza.

Os termos "sequência de DNA heterólogo," "segmento de DNA exógeno" ou "ácido nucleico heterólogo," como aqui usados, cada um se

refere a uma sequência originária de uma fonte estranha a uma célula hospedeira particular ou, se tiver a mesma origem, é modificada em relação à sua forma original. Portanto, um gene heterólogo em uma célula hospedeira inclui um gene que é endógeno da célula hospedeira particular, mas que foi modificado, por exemplo, através do uso de embaralhamento de DNA ou mutação. Estes termos incluem também múltiplas cópias que não ocorrem naturalmente de uma sequência de DNA que ocorre naturalmente. Portanto, os termos se referem a um segmento de DNA que é estranho ou heterólogo à célula, ou homólogo à célula, mas em uma posição dentro do genoma da célula hospedeira em que o elemento não é comumente encontrado. Segmentos de DNA exógenos são expressos para produzirem polipeptídeos exógenos. Uma sequência de DNA "homólogo" é uma sequência de DNA que está naturalmente associada à célula hospedeira na qual é introduzida.

Um "transgene" se refere a um gene que foi introduzido no genoma por transformação e é mantido estável. Transgenes podem incluir, por exemplo, genes que são heterólogos ou homólogos aos genes de uma planta específica a ser transformada. Adicionalmente, os transgenes podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo, ou genes quiméricos. O termo "gene endógeno" se refere a um gene nativo na sua localização natural no genoma de um organismo. Um gene "estranho" se refere a um gene normalmente não encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido por transferência de gene.

"Cassete de expressão" como aqui usado significa uma sequência de DNA capaz de dirigir a expressão de uma sequência de nucleotídeos particular em uma célula de hospedeiro adequada, compreendendo um promotor operavelmente ligado a um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas que está ligado operavelmente a um terminador. Ele tipicamente também compreende sequências necessárias para a tradução correta da sequência de nucleotídeos. A região de codificação geralmente codifica uma proteína de interesse, mas pode também codificar um RNA funcional de interesse, por exemplo, RNA antissenso ou um RNA não traduzido, na direcção senso ou antissenso. O cassete de expressão compreendendo o polinucleo-

tídeo de interesse codificando proteínas pode ser quimérico.

"Íntron" se refere a uma seção interveniente de DNA que ocorre quase exclusivamente em um gene eucariótico, mas que não é traduzido em sequências de aminoácidos no produto do gene. Os íntrons são removidos do mRNA pré-maduro através de um processo chamado "splicing", o qual deixa os éxons intactos, para formar mRNA. Para fins da presente invenção, a definição do termo "íntron" inclui modificações à sequência de nucleotídeos de um íntron derivado de um gene-alvo, desde que o íntron modificado não reduza significativamente a atividade da sua sequência reguladora 5' associada.

"Éxon" se refere a uma seção de DNA que transporta a sequência codificadora para uma proteína ou parte dela. Os éxons são separados por sequências não codificadoras intervenientes (íntrons). Para fins da presente invenção, a definição do termo "éxon" inclui modificações na sequência de nucleotídeos de um éxon derivado de um gene-alvo, desde que o éxon modificado não reduza significativamente a atividade da sua sequência reguladora 5' associada.

Os termos "proteína", "peptídeo" e "polipeptídeo" são aqui usados intercambiavelmente.

Uma "sonda" como aqui usada se refere a um fragmento de ácido nucleico definido (DNA ou RNA) de comprimento variável, que pode ser usado para detectar, em amostra contendo DNA ou RNA, sequência de nucleotídeos que são complementares à sequência representada pela molécula de sonda.

As moléculas de sonda podem ser usadas na configuração de um microarranjo, onde são ligadas covalentemente a uma matriz química em uma superfície inerte, tais como lâminas de vidro revestidas ou chips de genes à base de silicone. A hibridização das moléculas de sonda com um ácido nucleico alvo, em uma amostra, ocorre geralmente sob condições muito rigorosas. A hibridização da sonda-alvo é geralmente detectada e quantificada por detecção à base de fluorescência de alvos marcados com fluoróforo para determinar a abundância relativa de transcrito de sequências de ácido

nucleico no alvo. Os microarranjos de DNA podem ser usados em experimentos de perfil de expressão para quantificar a abundância do transcrito de uma molécula-alvo em amostras de tecido tais como os tecidos do pólen e/ou do pendão, calculada com base na força do sinal detectado nas respectivas amostras.

O termo "hibridizar" como aqui usado se refere a condições de hibridização convencionais, preferencialmente condições de hibridização nas quais a solução 1xDenhardts, 5xSSPE, 1% SDS, é usada como uma solução e/ou as temperaturas de hibridização são entre 35°C e 70°C, preferencialmente 65°C. Após a hibridização, a lavagem é preferencialmente realizada primeiro com 2xSSC, 1% SDS e subsequentemente com 0,2xSSC a temperaturas entre 35°C e 75°C, particularmente entre 45°C e 65°C, mas particularmente a 59°C (com vista à definição de SSPE, SSC e solução de Denhardts ver Sambrook et al. loc. cit.). As condições de hibridização muito rigorosas como, por exemplo, as descritas em Sambrook et al, supra, são particularmente preferidas. Condições de hibridização rigorosas, particularmente preferidas, estão, por exemplo, presentes se a hibridização e a lavagem ocorrerem a 65°C como indicado acima. Condições de hibridização não rigorosas, por exemplo, com hibridização e lavagem realizadas a 45°C são menos preferidas e ainda menos a 35°C.

"Homologia de Sequência ou Identidade de Sequência" é aqui usada intercambiavelmente. Os termos "idêntico" ou percentagem de "identidade" no contexto de duas ou mais sequências de ácido nucleico ou proteína, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são a mesma ou têm uma percentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos que são o mesmo, quando comparados e alinhados para correspondência máxima, como medido usando um dos seguintes algoritmos de comparação de sequência ou por inspecção visual. Se duas sequências que são para ser comparadas uma com outra diferirem no comprimento, a identidade de sequência se relaciona preferencialmente com a percentagem de resíduos de nucleotídeos da sequência mais curta que é idêntica aos resíduos de nucleotídeo da sequência mais longa. A identidade de

sequência pode ser determinada convencionalmente com o uso de programas de computador tais como o programa Bestfit (Wisconsin Sequency Analysis Package, Version 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). O Bestfit utiliza o algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, com vista a encontrar o segmento que tem a mais elevada identidade de sequência entre duas sequências. Quando se usa o Bestfit ou outro programa de alinhamento de sequência para determinar se uma sequência particular tem, por exemplo, 95% de identidade com uma sequência de referência da presente invenção, os parâmetros são preferencialmente ajustados, de modo que a percentagem de identidade seja calculada ao longo de todo o comprimento da sequência de referência e que são permitidas lacunas de homologia até 5% do número total de nucleotídeos na sequência de referência. Quando se usa o Bestfit, os chamados parâmetros opcionais são preferencialmente deixados como valores predefinidos ("padrão"). Os desvios que aparecem na comparação entre uma dada sequência e as sequências da invenção acima descritas podem ser causados, por exemplo, por adição, deleção, substituição, inserção ou recombinação. Tal comparação de sequência pode preferencialmente ser também realizada com o programa "fasta20u66" (versão 2.0u66, Setembro 1998 por William R. Pearson e a University of Virginia; ver também W.R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98, exemplos anexos e http://workbench.sdsc.edu/). Para este fim, podem ser usadas as definições de parâmetros "padrão".

Outra indicação de que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas hibridizam uma com a outra sob condições rigorosas. A frase: "hibridizando especificamente com" se refere à ligação, à duplexagem, ou à hibridização de uma molécula somente a uma sequência de nucleotídeos particular sob condições rigorosas quando essa sequência está presente em uma mistura complexa de DNA ou RNA (por exemplo, celular total). "Substancialmente ligado(s)" se refere à hibridização complementar entre um ácido nucleico de sonda e um ácido nucleico alvo e engloba desajustes menores que podem ser acomodados

reduzindo o rigor do meio de hibridização para atingir a desejada detecção da sequência de ácido nucleico alvo.

"Condições de hibridização rigorosas" e" condições de lavagem de hibridização rigorosas" no contexto dos experimentos de hibridização de ácido nucleico tais como hibridizações de Southern e de Northern são dependentes da sequência, e são diferentes sob parâmetros ambientais diferentes. Sequências mais longas hibridizam especificamente a temperaturas mais altas. 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 parte I capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probes assays" Elsevier, New York. Geralmente, a hibridização e as condições de lavagem de elevado rigor são selecionadas para serem cerca de 5°C abaixo do ponto térmico de fusão (T_m) para a sequência específica à força iônica e pH definidos. Tipicamente, sob "condições rigorosas" uma sonda vai hibridizar com a sua subsequência-alvo, mas não com outras sequências.

A T_m é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) à qual 50% da sequência-alvo hibridiza com uma sonda de correspondência perfeita. Condições muito rigorosas são selecionadas para serem iguais a T_m de uma determinada sonda. Um exemplo de condições de hibridização rigorosas para hibridização de ácidos nucleicos complementares que têm mais de 100 resíduos complementares em um filtro em Southern ou northern blot é 50% de formamida com 1 mg de heparina a 42°C, sendo a hibridização realizada durante a noite. Um exemplo de condições de lavagem extremamente rigorosas é NaCl a 0,15 M a 72°C durante cerca de 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem rigorosas é uma lavagem de 0,2X SSC a 65°C durante 15 minutos (ver, Sambrook, infra, para uma descrição de tampão SSC). Frequentemente, uma lavagem de elevado rigor é precedida por uma lavagem de baixo rigor para remover o sinal de fundo da sonda. Um exemplo de meio de lavagem rigoroso para um duplex de, por exemplo, mais que 100 nucleotídeos, é 0,1X SSC a 45°C durante 15 minutos. Um exemplo de lavagem de baixo rigor para um duplex de, por exemplo, mais de 100 nucleotí-

deos, é 4-6X SSC a 40°C durante 15 minutos. Para sondas curtas (por exemplo, cerca de 10 até 50 nucleotídeos), as condições rigorosas envolvem tipicamente concentrações salinas de menos de cerca de 1,0 M de íon Na^+, tipicamente concentração de cerca de 0,01 até 1,0 M de íon Na^+ (ou outros sais) a pH 7,0 até 8,3, e a temperatura é tipicamente pelo menos cerca de 30°C. Condições rigorosas podem também ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizadores tais como formamida. Em geral, um sinal para proporção de ruído de 2X (ou maior) que aquela observada para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridização particular indica detecção de uma hibridização específica. Os ácidos nucleicos que não hibridizam uns com os outros sob condições rigorosas são também substancialmente idênticos se as proteínas que codificam forem substancialmente idênticas. Isto ocorre, por exemplo, quando uma cópia de um ácido nucleico é criada usando a degenerescência de códon máxima permitida pelo código genético.

Uma "planta" é qualquer planta em qualquer estágio de desenvolvimento, particularmente uma planta de semente.

Uma "célula vegetal" é uma unidade estrutural e fisiológica de uma planta, compreendendo um protoplasto e uma parede celular. A célula vegetal pode estar na forma de uma única célula isolada ou uma célula cultivada, ou como parte de uma unidade mais organizada tal como, por exemplo, tecido vegetal, um órgão de planta, ou uma planta completa.

"Cultura de célula vegetal" significa culturas de unidades vegetais tais como, por exemplo, protoplastos, células em cultura celulares, células em tecidos vegetais, pólen, tubos polínicos, óvulos, sacos de embrião, zigotos e embriões em vários estágios de desenvolvimento.

"Material vegetal" refere-se a folhas, caules, raízes, flores ou partes de flores, frutos, pólen, células somáticas, zigotos, sementes, estacas, culturas de células ou tecido, ou qualquer outra parte ou produto de uma planta.

Um "órgão de planta" é uma parte diferenciada e distinta e visível estruturada de uma planta tal como uma raiz, caule, folha, gomo floral ou embrião.

"Tecido vegetal" como aqui usado significa um grupo de células vegetais organizadas em uma unidade estrutural e funcional. Qualquer tecido de planta plantada ou em cultura está incluído. Este termo inclui, mas não está limitado a, plantas completas, órgãos de plantas, sementes de plantas, cultura de tecidos e quaisquer grupos de células vegetais organizadas em unidades estruturais e/ou funcionais. "Tecido vegetal" inclui tecidos ou plantas diferenciadas e indiferenciadas, incluindo, mas, não se limitando a raízes, caules, rebentos, folhas, pólen, sementes, tecido tumoral e várias formas de células e culturas tais como células isoladas, protoplastos, embriões e tecido caloso. O tecido vegetal pode estar em plantas ou em órgãos, tecido ou cultura de células.

O uso deste termo em conjunto com, ou na ausência de, qualquer tipo específico do tecido vegetal como listado acima ou de outro modo incluído nesta definição não é entendido para ser exclusivo de qualquer outro tipo de tecido vegetal.

Os termos "milho graúdo", "milho" e "Zea mays" são aqui usados intercambiavelmente e se referem a plantas pertencendo ao gênero Zea incluindo, por exemplo, diferentes cepas, raças ou variedades, comerciais e não comerciais, da espécie de *Zea mays*.

A presente invenção se relaciona com uma planta transgênica compreendendo, estavelmente integrada no seu genoma, um construto de polinucleotídeo quimérico, particularmente um construto de DNA quimérico, compreendendo um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas, particularmente um polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína, sob controle de uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição dirigindo a expressão do referido polinucleotídeo de interesse codificando a proteína em essencialmente todos os tecidos da planta com a exceção dos tecidos das estruturas reprodutoras masculinas, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Uma sequência de nucleotídeos reguladora, de acordo com a

presente invenção, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição que medeia a expressão de um polinucleotídeo de interesse codificando proteínas operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta exceto nos tecidos das estruturas reprodutoras masculinas, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, podem ser obtidos em um experimento de perfil de expressão para triagem de sondas que dão fortes sinais em todas as amostras, mas somente um fraco ou nenhum sinal na amostra de pólen e/ou do pendão, o que é indicativo da expressão dos respetivos polinucleotídeos representados pelas referidas sondas na maior parte dos tecidos da planta e de nenhuma ou substancialmente nenhuma expressão nos tecidos do pólen e/ou do pendão. Em especial, tecidos vegetais de milho graúdo e tecidos das estruturas reprodutoras, particularmente tecidos do pólen e/ou do pendão podem ser rastreados para identificar e obter uma sequência reguladora, de acordo com a presente invenção.

Em especial, amostras de todos os tecidos vegetais, particularmente amostras dos tecidos verdes e das raízes da planta de milho graúdo, podem ser diretamente comparadas com as amostras de tecido das estruturas reprodutoras masculinas, particularmente amostras de tecido do pólen e/ou do pendão. Sondas representando polinucleotídeos que não atingem o perfil expressão-alvo são eliminadas. Somente aquelas sondas com o sinal mais forte ao longo de todos os tecidos que não pólen/pendão e fraco ou sem sinal no pólen e/ou no pendão são selecionadas para análises adicionais, ou seja, sondas representando polinucleotídeos que são altamente expressos em todas as amostras de tecido, mas não substancialmente expressos no pólen e/ou no pendão. As referidas sondas podem então ser alinhadas com um conjunto de dados de montagem de cDNA de plantas para detectar genes genuínos de plantas, particularmente genes de milho graúdo ou genes de milho graúdo putativos.

A sequência de DNA representando sondas identificadas no chip do milho graúdo como representando genes que são altamente expressos em todas as amostras de tecido, mas essencialmente não expressos no pólen, particularmente sondas representadas pela sequência de DNA como

dado na SEQ ID NOs: 47 até 56 e aquelas representando genes que são altamente expressos em todas as amostras de tecido e não têm essencialmente ou têm reduzida expressão nas amostras de pendão, particularmente sondas representadas pela sequência de DNA dada na SEQ ID NOs: 57-79, pode facilmente ser alargada aos designados cassetes de expressão seguindo as etapas descritas nos Exemplos.

Sequências candidatas à sonda provenientes da análise de perfil de expressão para cada categoria de expressão podem ser selecionadas e evoluírem para um vetor binário acabado com o cassete de expressão designado ligado a um gene de interesse tal como, por exemplo, um gene reportado, isto é, o gene repórter GUS.

Em uma primeira etapa, cada cassete de expressão é flanqueado com um ou mais sítios de restrição adequados tais como, por exemplo, sítios SanDI/RsrII e clonado na molécula de vetor. A região reguladora incluindo a função de iniciação da transcrição normalmente se encontra dentro de um fragmento de cerca de 1000-1500 pb a montante do sítio de início da transcrição e se estende até o segundo éxon, ou ao códon de iniciação da tradução natural se não for no primeiro éxon. Tipicamente termina com a sequência Kozak 'gtaaaccatgg' otimizada de milho graúdo. O códon de início da tradução modificado é então incorporado em um sítio de restrição adequado tal como o sítio de restrição de endonuclease NcoI 'ccatgg'. Todos os códons de início da tradução no transcrito teórico que estão a montante do sítio de restrição modificado são eliminados. Pelo menos um códon de paragem deve estar presente em cada estrutura de leitura a montante do sítio de restrição engenheirado. A região reguladora incluindo a função de iniciação da transcrição é desenhada para ser flanqueada por sítios de restrição adequados tais como, por exemplo, sítios XhoI/SanDI na extremidade 5' e em um sítio NcoI na extremidade 3'.

O Gene de Interesse (GOI) tal como o gene repórter GUS é fornecido como um fragmento de restrição adequado, no exemplo dado aqui como um fragmento NcoI/SacI. O terminal se estende desde logo a seguir ao códon stop da tradução durante cerca de 1 kb a jusante. O terminal é dese-

nhado para ser flanqueado por sítios de restrição adequados tais como, por exemplo, SacI na extremidade 5' e RsrII/XmaI na extremidade 3'.

O cassete de expressão completo é desenhado para ser mobilizado como um fragmento de restrição adequado, tal como um fragmento SanDI/RsrII, o qual pode ser ligado no sítio correspondente localizado num Vetor binário de *Agrobacterium* tal como o vetor dado na SEQ ID NO: 80.

Todos os sítios de restrição internos usados nas etapas de clonagem identificadas acima são mutados por substituições de base única para silenciá-los.

Através da aplicação destas etapas básicas, um cassete de expressão da planta pode ser desenhado para que corresponda às moléculas de sonda respectivas, particularmente moléculas de sonda no chip de milho graúdo identificado como representando genes que são altamente expressos em todas as amostras de tecido, mas essencialmente não expressos no pólen, particularmente sondas representadas pela sequência de DNA como dado nas SEQ ID NOs: 47 até 56 e as identificadas como representando genes que são altamente expressos em todas as amostras de tecido e têm essencialmente nenhuma ou reduzida expressão em amostras de pendão, particularmente sondas representadas pela sequência de DNA como dado nas SEQ ID NOs: 57-79. A primeira é um cassete de expressão que deve ser transcrito em todos os tecidos de milho graúdo e não no pólen. A última é um cassete de expressão que deve ser transcrito em todos os tecidos de milho, mas não ou somente moderadamente transcrita nos pendões. Esta estratégia de design pode ser aplicada a todas as sondas identificadas em um experimento de perfil de expressão.

Em uma modalidade específica da invenção, aplicar os critérios acima resulta na identificação de genes que exibem o perfil de expressão desejado. Em particular, é identificado um gene que codifica uma proteína de ligação à actina 3 (ABP3), particularmente uma proteína de ligação à actina 3 de milho graúdo (ZmABP3), que é um membro de uma pequena família de genes, que haviam sido previamente caracterizados (Lopez et al., 1996). O produto do gene tem também sido chamado fator de despolimeri-

zação de actina 3.

Foi demonstrado por análise de southern que existem dois genes ABP3 no genoma do milho graúdo (Lopez et al., 1996), aqui designado como ZmABP3-A e ZmABP3-B, respectivamente. Os cDNAs de ZmABP3-A e ZmABP3-B codificam uma proteína de 139 aminoácidos que são idênticos em todos os resíduos, exceto um. Os dados de perfil de expressão indicam que ZmABP3-B é altamente expresso na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, enquanto que ZmABP3-A não é tão altamente expresso.

Uma análise estrutural do gene ZmABP3-B revela que a região codificando a proteína ZmABP3-B é codificada em 3 éxons, que são interrompidos por duas sequências intervenientes (íntrons) flanqueadas pelos nucleotídeos de fronteira esperados GT...AG.

A sequência reguladora está localizada na região 5' do gene ABP3 imediatamente a montante da sequência codificadora. O tamanho da região reguladora é em uma faixa de entre cerca de 2 kb até 3 kb, particularmente entre cerca de 2,3 kb e 2,5 kb, e compreende uma sequência 5' não transcrita, particularmente uma sequência 5' não transcrita de entre cerca de 0,9 kb e 1,3 kb, mas particularmente de cerca de 1,1 kb, e uma 5' UTR, particularmente entre cerca de 0,1 kb e 0,3 kb, mas particularmente 0,25 kb de 5' UTR e toda ou parte de uma sequência de nucleotídeos representando ZmABP3-íntron 1, particularmente uma sequência de nucleotídeos de entre cerca de 0,7 kb e 1,2 kb, mas particularmente de cerca de 0,98 kb.

A sequência reguladora, de acordo com a invenção, compreende adicionalmente parte da sequência 3' que começa apenas após o códon stop da tradução ABP3 incluindo a sequência transcrita, mas não traduzida (UTR) e a sequência não transcrita que funciona como terminador transcricional e um sinal de poliadenilação. Em particular, a sequência 3' está em uma faixa entre cerca de 0,8 kb e cerca de 1,2 kb, particularmente entre cerca de 0,9 kb e cerca de 1,1 kb, mas particularmente cerca de 1,013 kb. O tamanho da 3'-UTR varia entre cerca de 0,2 kb e cerca de 0,4 kb, mas particularmente

cerca de 0,3 kb, e o da sequência não transcrita varia entre cerca de 0,5 kb e cerca de 0,8 kb, mas especificamente cerca de 0,7 kb.

Em uma modalidade específica da invenção, a sequência reguladora é modificada, de modo que o códon de iniciação da tradução natural seja silenciado para movê-lo para o segundo éxon.

Em uma outra modalidade da invenção, as sondas candidatas podem ser identificadas em um chip de DNA ou arranjo de genes, particularmente um chip de DNA ou arranjo de genes de milho graúdo tal como, por exemplo, o Chip Affymetrix® de milho graúdo aplicando o critério acima, que pode ser usado na identificação dos genes ou genes putativos no genoma do milho graúdo, o qual exibe o desejado perfil de expressão. Foram identificadas duas sondas candidatas que não apresentam virtualmente nenhum sinal no pendão, mas apresentam um elevado sinal nos outros tecidos. Isto indica que o gene representado pelas referidas sondas candidatas não é expresso no pendão, mas é altamente expresso no resto da planta. O maior diferencial de expressão, 60 vezes maior no tecido que não pendão, foi observado na sonda candidata Zm033444_S_AT. A outra sonda candidata (Zm040564_X_AT) mostrou variação de sinal dependente do estado de desenvolvimento do material da planta sondada, isto é, um sinal baixo no pendão jovem que aumenta gradualmente até um sinal alto ou forte quando a planta se torna mais velha. A força de sinal entre amostras de pendão e de não pendão difere em menos de 10 vezes, mas a força de sinal nas amostras que não pendão foi aproximadamente 10 vezes superior quando comparado com a outra sonda candidata. Os dados de sequência indicam que nenhuma das sondas corresponde a um gene caracterizado. Ambas as sondas identificam bons genes candidatos para desenvolvimento de promotores que atribuam alta expressão no tecido que não pendão e pouca ou nenhuma expressão nos pendões. Dado o alto diferencial de sinal entre amostras de pendão e que não pendão, foi desenvolvido um cassete de expressão com base na sonda Zm033444_S_AT.

Bases de dados públicas e privadas podem ser consultadas por BLASTN com a sequência Zm033444_S_AT de sonda candidata para obter

evidência de sequência de DNA para ambos os transcritos de gDNA correspondentes a Zm033444_S_AT. Resultados de cDNA com correspondência exata em relação à sequência de pesquisa se inserem em dois contigs semelhantes. O ZmABT1 corresponde a Maize.1482.c47 e Maize.1908.c31, e ZmABT2 corresponde a Maize.1482.c32, Maize.1482.c28, maize.1482.c53, Maize.1908.c17, Milho.1908.c20, Milho.1908.c37 e AI947567.

As sequências Zm033444_S_AT, ZmABT1 e ZmABT2 podem então ser usadas para pesquisar as bases de dados da sequência do DNA genômico de milho para identificar a(s) sequência(s) reguladora(s) que conferem elevada expressão no tecido que não pendão e pouca ou nenhuma expressão nos pendões. Estas pesquisas identificaram três entradas, AZM4_12, ZmGSStuc11-12-04.4740.1 e MAGI_88845, que se reúnem em um único contig. A sequência de gDNA ZmABT é mostrada na SEQ ID NO: 46. Ela codifica ambos os transcritos ZmABT1 e ZmABT2, o que sugere que eles são alternativamente variantes sujeitas à remoção de íntrons do mesmo transcrito.

O ZmABT1 é codificado nos 5 éxons, e o ZmABT2 é codificado nos 6 éxons. O éxon adicional se situa entre o éxon 1 e o éxon 2 de ZmABT1. A maior estrutura de leitura aberta em ZmABT1 e ZmABT2 pode ser usada para definir os seus códons de paragem e início da tradução e também para definir a localização de cada códon de início e stop da tradução. Através desta análise, ambos os cDNAs usam o mesmo códon de início e stop da tradução.

Em um aspecto importante da presente invenção, a sequência reguladora, de acordo com a invenção, pode ser usada no desenvolvimento de cassetes de expressão robustos que expressam genes recombinantes na maior parte dos tecidos da planta, mas não ou substancialmente não expressam nos tecidos das estruturas reprodutoras masculinas, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade específica da invenção, uma sequência reguladora obtenível a partir do gene ABP3, mais particularmente da sequên-

cia reguladora obtenível de um gene de *Zea mays* ABP3, pode ser usada no desenvolvimento de cassetes de expressão robustos que expressam genes recombinantes na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

A região de iniciação da transcrição da sequência reguladora, de acordo com a invenção, particularmente da sequência reguladora obtenível a partir do gene ABP3, mais particularmente da sequência reguladora obtenível de um gene ABP3 de *Zea mays* pode ser obtida em uma reação de PCR contendo um par de iniciadores envolvendo o iniciador direto P1 (5'-atatatgcatgzcggcgcgccgaaagtagcaaacaacaggttcatgtgcac-3') como descrito na SEQ ID NO: 1 e o iniciador reverso P2 (5'-tatataccatggtgggtttgcctgcgaccacaagttca-3') como descrito na SEQ ID NO: 2 através de amplificação a partir de um padrão de gDNA, particularmente um padrão de gDNA de milho graúdo. Em uma modalidade específica da invenção, é aplicado um programa de termociclagem envolvendo amplificação a cerca de 95°C durante cerca de 15 minutos seguido por cerca de 45 ciclos a cerca de 94°C durante cerca de 1 minuto, a cerca de 64°C durante cerca de 1 minuto e a cerca de 72°C durante cerca de 5 minutos. A etapa de extensão final é realizada a cerca de 72°C durante cerca de 15 minutos. O produto da reação, particularmente um produto da reação de cerca de 2,3 kb, é purificado e o DNA extraído usando um método de extração de DNA conhecido na técnica. O DNA é precipitado, recuperado e finalmente clonado em um vetor adequado.

A região de iniciação da transcrição, de acordo com a invenção, particularmente uma região de iniciação da transcrição obtenível a partir de um gene ABP3, mais particularmente obtenível a partir de um ZmABP3, pode ser modificada em uma série de reações usando pelo menos um dos oligonucleotídeos selecionados a partir do grupo de oligonucleotídeos descrito na

-SEQ ID NO: 3 (Patg (5'-cagctcgcccgagttggtaaggcccct-3')),

-SEQ ID NO: 4 ...(Pnco (5'-acagattagtccatcgcccacggt-3')),

-SEQ ID NO: 5... (ADPc-1 (5'-agccctgtccatgacggcccaagcaac-3')),

-SEQ ID NO: 6... (ADPc-2 (5'-agtagcaattcggtaggcacaggcac-3')),

-SEQ ID NO: 7... (ADPc-4 (5'-tctatggtctgcgaggtgcggtggc-3')), e

-SEQ ID NO: 8... (adp3-a (5'-gtccccttcttcgccgcgccagctcgc-3')).

O terminal da sequência reguladora, de acordo com a invenção, particularmente uma sequência terminal obtenível a partir de um gene ABP3, mais particularmente uma sequência terminal obtenível a partir de um ZmABP3, pode ser amplificada a partir de um padrão de gDNA, particularmente um padrão de gDNA de milho graúdo, em uma reação de DNA polimerase usando um iniciador direto (P3(5'-tatatagagctcgcatcatgatcatgcatcatggact-3')) como descrito na SEQ ID NO: 9 e um iniciador reverso (P4 (5'-atatatactagtggcgcgccacactttctgtcgcatgtgatttgca-3')) como descrito na SEQ ID NO: 10. Um programa de termociclagem pode ser aplicado compreendendo um primeiro ciclo de cerca de 95°C durante cerca de 5 minutos seguidos de cerca de 45 ciclos de cerca de 94°C durante cerca de 30 segundos, cerca de 50°C durante cerca de 1 minuto e cerca de 72°C durante cerca de 4 minutos. A etapa de extensão final pode ser realizada a cerca de 72°C durante cerca de 15 minutos. O produto de reação de cerca de 1 kb é depois purificado e o DNA extraído usando métodos de extração padrão. O DNA é precipitado, recuperado e clonado em um vetor adequado.

O terminal da sequência reguladora, de acordo com a invenção, particularmente uma sequência terminal obtenível a partir de um gene ABP3, mais particularmente uma sequência terminal obtenível a partir de um ZmABP3, pode ser modificada para remover um sítio de restrição interno, particularmente um sítio de restrição NcoI usando um par de iniciadores adequados, particularmente o par de iniciadores Tnco (5'-Pgtaaaaaaaggtcccttggctcccagaaga-3') / T2 (5'-Pcaatgtgttagactgacgtg-3') como descrito nas SEQ ID NO: 11 e SEQ ID NO: 12, respectivamente, em uma reação de DNA polimerase. O programa de termociclagem usado pode compreender um primeiro ciclo a cerca de 95°C durante cerca de 5 minutos seguido por cerca de 30 ciclos de cerca de 95°C durante cerca de 1 minuto, cerca de 50°C durante cerca de 1 minuto e cerca de 65°C durante cerca de 15 minutos. O produto pode então ser processado e sequenciado.

A presente invenção é também dirigida para cassetes de ex-

pressão que incorporam os mecanismos reguladores de um gene-alvo de interesse que apresenta o desejado perfil de expressão, que tem alta expressão na maior parte dos tecidos da planta, mas nenhuma expressão no tecido do pólen, particularmente um gene alvo ABP, mais particularmente de um gene-alvo ZmABP3, para controlar, nas plantas, a expressão de produtos de moléculas de ácido nucleico de interesse de um modo que mimetize o perfil de expressão do gene-alvo original.

A presente invenção inclui ainda cassetes de expressão que incorporam sequências reguladoras obteníveis a partir da região 5' do gene-alvo, particularmente um gene-alvo ABP, mais particularmente de um gene-alvo ZmABP3, para expressar os produtos de moléculas de ácido nucleico de interesse em tecidos vegetais, mas não ou substancialmente não expressá-los nos tecidos do pólen. A presente invenção é também dirigida para cassetes de expressão incorporando ambas as sequências reguladoras obteníveis a partir da região 5' e da região 3' do gene-alvo, particularmente um gene-alvo ABP3, mais particularmente de um gene-alvo ZmABP3.

Em uma outra modalidade específica da invenção, uma sequência reguladora obtenível a partir do DNA genômico de milho pode ser usada mo desenvolvimento de cassetes de expressão robustas que transcrevem polinucleotídeos na maior parte dos tecidos da planta mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Uma estratégia de design com base na estrutura do gene inclusivo pode ser usada para construir esse cassete de expressão. Para incorporar a splicing alternativa conhecida do gene putativo de milho graúdo identificado em um método como descrito acima em um cassete de expressão, a estratégia de design pode ser baseada na estrutura do transcrito ZmABT1 como mostrado na SEQ ID NO: 33.

A região de iniciação da transcrição da sequência reguladora, de acordo com a invenção, particularmente da região promotora ZmABT pode ser amplificada a partir de um padrão de gDNA de milho graúdo em uma reação de DNA polimerase contendo gDNA e um par de iniciadores envolven-

do o iniciador direto ABT P1 forw (5'- CGACCAGCGCGACATGCATGGCA-3') como descrito na SEQ ID NO: 19 e o ABT P2 rev (5'- ACCCCAGGGCG-TACGACAAGGCC-3') como descrito na SEQ ID NO: 20. Em uma modalidade específica da invenção, um programa de termociclagem é aplicado envolvendo amplificação a cerca de 95°C durante cerca de 5 minutos seguidos de cerca de 40 ciclos de 94°C durante cerca de 30 segundos, cerca de 67°C durante cerca de 30 segundos e cerca de 72°C durante cerca de 2,5 minutos. A etapa final de extensão foi feita a cerca de 72°C durante cerca de 10 minutos.

Esta reação de amplificação conduz a um produto de amplificação de cerca de 2,6 kb, que pode ser purificado e o DNA extraído usando um método-padrão de extração de DNA. O DNA pode então ser clonado em um vetor adequado tal como, por exemplo, o vetor pCR-BluntII-TOPO.

O promotor ZmABT pode ser modificado em uma série de reações de mutagênese para silenciar o códon de início da tradução endógeno, silenciar um sítio de restrição de SanDI e corrigir mutações pontuais criadas durante a amplificação. Isto pode ser feito em uma série de reações usando pelo menos um dos oligonucleotídeos selecionados a partir do grupo de oligonucleotídeos descrito na

-SEQ ID NO: 21 pABT mut1 (5'-GATGGCCGGATTGGGCTCCCGGGGTGGAG-3')
-SEQ ID NO: 22 pABT mut2 (5'-CTGGGAGGCGCGCAAGGGGCAGTTCCTCG-3')
-SEQ ID NO: 23 pABT mut3 (5'-CCCACCGCCGGAGCACCGAAAGGCCCCGCG-3')
-SEQ ID NO: 24 pABT mut4 (5'-GTCACCCGGGAGCACTTCCCGGCGCCG-3')
-SEQ ID NO: 25 pABT mut5 (5'-CATTGGGCCGAGCACGGCTTCTTCCGC-3')
-SEQ ID NO: 26 pABT mut6 (5'-GGGGTACGGTGTTCTTGAGTCGTGAAGCGAC-3')

O promotor ZmABT modificado pode ser amplificado em uma outra reação de PCR usando os iniciadores pABT amp1 (5'- GCGTC-TAGAGGGACCCCGACCAGCGCGACATGCATGGCA-3') como descrito na SEQ ID NO: 27 e pABT amp2 (5'-ACCCCAGGGCGTACGACAAGGCCCCA-CCATGGGCGC-3') como descrito na SEQ ID NO: 28. O produto PCR pode então ser purificado e o DNA extraído usando um método padrão de extração de DNA. O DNA pode ser clonado num vetor adequado tal como, por

exemplo, o vetor pCR-BluntII -TOPO, transformado e sequenciado. O promotor ZmABT pode então ser excisado, particularmente como um fragmento XbaI/NcoI e ligado a um vetor de expressão adequado tal como, por exemplo, pNOV6901.

Em uma modalidade da invenção, é fornecido um cassete de expressão compreendendo uma sequência de terminação que pode ser obtida a partir do gene ZmABT identificado e descrito aqui acima. O terminal ZmABT pode ser amplificado a partir do modelo gDNA de milho em uma reação de DNA polimerase contendo gDNA e um par de iniciadores envolvendo o iniciador direto ABT P4 (5'-TATATAGAGCTCGAATCGAAGAAGCCACACTGTAAATCTGCCGGG-3') como descrito na SEQ ID NO: 29 e o iniciador reverso ABT P5 (5'-AGCAAGGCATATGCAGCAGCTGCTGGTCGGACCGGGCCCTATATA-3') como descrito na SEQ ID NO: 30 resultando num produto de amplificação de cerca de 1 kb. Este produto de reação pode ser purificado e o DNA extraído usando um método-padrão de extração de DNA. O DNA purificado pode então ser clonado num vetor adequado tal como, por exemplo, o vetor pCR4-TOPO-Blunt.

Em uma modalidade da invenção, o terminal ZmABP3 é modificado para remover os sítios de restrição internos NcoI e XhoI. Isto pode ser feito em uma série de reações usando pelo menos um dos oligonucleotídeos selecionados a partir do grupo de oligonucleotídeos descritos em

-SEQ ID NO: 31 ABTt m1 (5'- GTCATGCATGGGCATGTGAAGGAGGAGCC-3')

-SEQ ID NO: 32 ABTt m2 (5'- GTTGCATGCATGCTGCATGGCGTCGAGAT-3')

O produto de amplificação pode então ser processado e sequenciado para resultar em uma sequência terminadora como mostrado na SEQ ID NO: 36.

Em uma modalidade da invenção, é fornecido um cassete de expressão que expressa genes recombinantes na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, compreendendo ambos uma sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição e uma

sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de terminação, sequências reguladoras essas que podem ser obtidas a partir do gene ZmABT identificado e descrito aqui acima.

Em uma modalidade da invenção, um tal cassete de expressão pode ser obtido por excisão do terminal ZmABT excisado e ligando-o em um vetor adequado que já compreende uma sequência reguladora em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição, particularmente a sequência do promotor ZmABT tal como, por exemplo, o vetor pNOV6901-prABT conforme descrito acima.

Em uma modalidade, o cassete de expressão, de acordo com a invenção compreende uma sequência de nucleotídeos reguladora compreendendo aproximadamente 2,6 kb da sequência 5', que consiste aproximadamente em 2 kb da sequência 5' não transcrita, e cerca de 12 pb de 5' UTR, aproximadamente 0,6 kb representando o éxon 1, íntron 1 e cerca de 16 pb do éxon 2; e aproximadamente 1 kb da sequência 3' que começa mesmo após o códon de paragem da tradução e inclui aproximadamente 0,6 kb de -3' UTR e cerca de 0,4 kb de sequência não transcrita, e funciona como terminador transcricional e sinal de poliadenilação.

Em uma modalidade, é fornecido um cassete de expressão, de acordo com a invenção, em que o códon natural de iniciação da tradução é silenciado e movido para o segundo éxon.

O cassete de expressão completo pode então ser mobilizado para um vetor adequado para transformação e expressão de plantas tais como, por exemplo, um vetor binário de *Agrobacterium*, particularmente vetor binário 15289 de *Agrobacterium*.

O segmento de ácido nucleico de interesse pode, por exemplo, codificar um RNA ribossomal, um RNA antissenso ou qualquer outro tipo de RNA que não é traduzido na proteína. Em uma outra modalidade preferida da invenção, o segmento de ácido nucleico de interesse é traduzido em um produto de proteína. A sequência de nucleotídeos que dirige a transcrição e/ou o segmento de ácido nucleico pode ser de origem homóloga ou heteróloga no que diz respeito à planta a ser transformada. Uma molécula de DNA

recombinante útil para introdução nas células vegetais inclui uma que tenha sido derivada ou isolada a partir de qualquer fonte que pode ser subsequentemente caracterizada quanto ao tamanho da estrutura e/ou função, quimicamente alterada, e depois introduzida nas plantas. Portanto uma sequência de nucleotídeos, segmento ou fragmento de interesse útil inclui DNA completamente sintético, DNA semissintético, DNA isolado a partir de fontes biológicas, etc. Geralmente, o DNA introduzido não é originalmente residente no genótipo da planta que é o destinatário do DNA, mas está dentro do escopo da invenção isolar um gene a partir de um dado genótipo da planta e, posteriormente, introduzir múltiplas cópias do gene no mesmo genótipo, por exemplo, para aumentar a produção de um dado produto de gene tal como uma proteína de armazenamento ou uma proteína que está envolvida no metabolismo dos carbohidratos ou qualquer outro gene de interesse como fornecido na SEQ ID NOs da listagem de sequências.

A molécula de DNA recombinante introduzida inclui, mas não se limita a, DNA de genes vegetais, e genes não vegetais tais como os de bactérias, leveduras, animais ou vírus. O DNA introduzido pode incluir genes modificados, porções de genes, ou genes quiméricos, incluindo genes do mesmo ou de genótipo diferente. O termo "gene quimérico" ou "DNA quimérico" é definido como um gene ou uma sequência de DNA ou segmento compreendendo pelo menos duas sequências de DNA ou segmentos de espécies que não combinam DNA em condições naturais, ou em que as sequências de DNA ou segmentos estão posicionados ou ligados de um modo que não ocorra normalmente no genoma nativo de plantas não transformadas.

A molécula de DNA recombinante introduzida usada aqui para a transformação pode ser circular ou linear, de fita dupla ou fita única. Geralmente, o DNA está na forma de DNA quimérico, tal como DNA de plasmídeo.

Em uma modalidade, as sequências reguladoras podem ser operavelmente associadas a um polinucleotídeo de interesse expressável. O polinucleotídeo expressável pode codificar um polipeptídeo ou proteína de interesse.

Esse polipeptídeo ou proteína de interesse pode ser um exibindo

uma determinada atividade biológica tal como, por exemplo, uma atividade inseticida, herbicida ou fungicida ou pode contribuir para um melhor desempenho de uma planta de cultivo de interesse agronômico na forma de melhor rendimento, qualidade, instalação, resistência a estresse biótico e abiótico, controle de floração, etc.

Em uma modalidade, a concentração do produto polipeptídico expresso a partir do polinucleotídeo de interesse codificando proteínas nos tecidos das estruturas reprodutoras, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, é de modo que nenhuma atividade inseticida possa ser detectada em um ensaio-padrão de alimentação de insetos. Em particular, a concentração do produto de expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras masculinas, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, é inferior ao nível básico de cerca de 10 ng/mg de proteína solúvel, particularmente de cerca de 5 ng/mg de proteína solúvel, mais particularmente de cerca de 3 ng/mg de proteína solúvel, mas especialmente de cerca de 2 ng/mg de proteína solúvel ou inferior.

Em uma modalidade específica da invenção, o polipeptídeo ou a proteína de interesse é uma proteína ou um polipeptídeo ativo como inseticida, particularmente uma proteína ou polipeptídeo ativo como inseticida obtenível a partir de *Bacillus thuringiensis*, mais particularmente uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* tal como, por exemplo, endotoxina crylA(b). Outras endotoxinas conhecidas que ocorrem em *Bacillus thuringiensis* podem igualmente ser usadas em associação com a sequência reguladora de acordo com a invenção para obter expressão de toxina na maior parte dos tecidos da planta exceto no pólen e/ou no pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrita, em que o polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem pelo menos 80% de identidade de sequência, particularmente pelo menos 85% de identidade de sequência, particularmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de

identidade de sequência com uma sequência de nucleotídeos como descrito na SEQ ID NO:15.

Em uma modalidade, é fornecida uma planta transgênica, de acordo com a invenção, e como aqui descrito, em que o polinucleotídeo de interesse codificando polipeptídeo ou proteína codifica uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que tem a sequência de nucleotídeos como descrita na SEQ ID NO: 15.

Uma vez completado, o cassete de expressão pode ser mobilizado em um vetor adequado para transformação de plantas, tal como, por exemplo, um vetor binário, que pode depois ser mobilizado para o milho graúdo por via de transformação mediada por *Agrobacterium*.

Plantas transgênicas (ou células vegetais, ou explantes vegetais, ou tecidos vegetais) incorporando os polinucleotídeos da invenção e/ou expressando um polipeptídeo de interesse tal como, por exemplo, uma proteína de toxina de *B. thuringiensis*, pode ser produzida por várias técnicas bem estabelecidas. Após construção de um cassete de expressão e de um vetor incorporando a sequência de polinucleotídeos reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito, podem ser usadas técnicas-padrão para introduzir o polinucleotídeo em uma planta, em uma célula vegetal, em um explante vegetal ou em um tecido vegetal de interesse. Opcionalmente, a célula, o explante ou o tecido da planta pode ser regenerado para produzir uma planta transgênica. A planta pode ser qualquer planta superior, incluindo plantas gimnospêrmicas, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Protocolos adequados estão disponíveis para Leguminosae (alfalfa, soja, trevo, etc.), Umbelliferae (cenoura, aipo, cherovia), Cruciferae (couve, rabanete, colza, brócolos, etc.), Curcurbitaceae (melões e pepino), Gramineae (trigo, milho, arroz, cevada, painço, etc.), Solanaceae (batata, tomate, tabaco, pimentos, etc.), e várias outras culturas. Ver os protocolos descritos em Ammirato et al., eds., (1984) Handbook of Plant Cell Culture-Crop Species, Macmillan Publ. Co., New York, N.Y.; Shimamoto et al. (1989) Nature 338: 274 276; Fromm et al. (1990) Bio/Technol. 8: 833 839; e Vasil et al. (1990) Bio/Technol. 8: 429 434. A transformação e a regeneração de células vegetais de monocotiledô-

neas e dicotiledôneas são agora uma rotina, e a seleção da técnica de transformação mais apropriada será determinada pelo profissional. A escolha do método variará com o tipo de planta a ser transformada; os versados na técnica reconhecerão a adequabilidade de métodos específicos para dados tipos de planta. Métodos adequados podem incluir, mas não se limitam a: eletroporação de protoplastos vegetais; transformação mediada por liposoma; transformação mediada por polietileno glicol (PEG); transformação usando vírus; microinjeção de células vegetais; bombardeamento das células vegetais com micro-projéteis; infiltração em vácuo; e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A transformação de plantas pode ser efetuada com uma única molécula de DNA ou múltiplas moléculas de DNA (isto é, cotransformação), e estas duas técnicas são adequadas para uso com os cassetes de expressão da presente invenção. Numerosos vetores de transformação estão disponíveis para a transformação de plantas, e os cassetes de expressão desta invenção podem ser usados em conjunto com qualquer dos vetores. A seleção do vetor vai depender da técnica de transformação preferida e das espécies-alvo para transformação.

Várias técnicas estão disponíveis e são conhecidas dos versados na técnica para introdução de construtos em uma célula vegetal hospedeira. Estas técnicas geralmente incluem transformação com DNA empregando *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes* como agente de transformação, lipossomas, precipitação de PEG, eletroporação, injeção de DNA, absorção direta de DNA, bombardeamento a microprojéteis, aceleração de partículas, e similares (Ver, por exemplo, EP 295959 e EP 138341) (ver abaixo). No entanto, células que não células vegetais podem ser transportadas com os cassetes de expressão da invenção. As descrições gerais de vetores de expressão e genes repórteres de plantas, e o *Agrobacterium* e transferência de genes mediada por *Agrobacterium*, podem ser encontradas em Gruber et al. (1993).

Vetores de expressão contendo a sequência de polinucleotídeos reguladora, de acordo com a invenção, podem ser introduzidos nos protoplastos ou nos tecidos intactos ou células isoladas. Preferencialmente os

vetores de expressão são introduzidos no tecido intacto. Métodos gerais de cultivo de tecidos vegetais são dados, por exemplo, por Maki et al., (1993); e por Phillips et al. (1988). Preferencialmente, os vetores de expressão são introduzidos no milho graúdo ou outros tecidos vegetais usando um método de transferência direta de genes tal como aplicação mediada por microprojétil, injeção de DNA, eletroporação e similares. Mais preferencialmente, os vetores de expressão são introduzidos nos tecidos de plantas usando os meios de aplicação por meio de microprojétil com o dispositivo biolístico. Ver, por exemplo, Tomes et al. (1995). Os vetores da invenção podem não só ser utilizados para expressão dos genes estruturais, mas podem também ser usados em clonagem com armadilhas de éxon ou procedimentos de captura de promotores para detectar a expressão diferencial de genes em vários tecidos, (Lindsey et al., 1993; Auch & Reth et al.).

É particularmente preferido usar os vetores de tipo binário de plasmídeos Ti e Ri de *Agrobacterium spp.* Vetores derivados de Ti transformam uma larga variedade de plantas superiores, incluindo plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como soja, algodão, colza, tabaco, e arroz (Pacciotti et al., 1985: Byrne et al., 1987; Sukhapinda et al., 1987; Lorz et al., 1985; Potrykus, 1985; Park et al., 1985: Hiei et al., 1994). O uso de T-DNA para transformar células vegetais tem sido extensivamente estudado e está amplamente descrito (EP 120516; Hoekema, 1985; Knauf, et al., 1983; e An et al., 1985). Para introdução nas plantas, os genes quiméricos da invenção podem ser inseridos nos vetores binários como descrito nos exemplos.

Os versados na técnica compreenderão que a escolha do método pode depender do tipo de planta, isto é, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, alvo para transformação. Métodos adequados de transformação de células vegetais incluem, mas não estão limitados a, microinjeção (Crossway et al., 1986), eletroporação (Riggs et al., 1986), transformação mediada por Agrobacterium (Hinchee et al., 1988), transferência direta de genes (Paszkowski et al., 1984), aceleração balística de partículas usando dispositivos disponíveis em Agracetus, Inc., Madison, Wis. e BioRad, Hercules, Calif. (ver, por exemplo, Sanford et al., Patente U.S.. No. 4.945.050; e McCabe

et al., 1988). Ver também, Weissinger et al., 1988; Sanford et al., 1987 (cebola); Christou et al., 1988 (soja); McCabe et al., 1988 (soja); Datta et al., 1990 (arroz); Klein et al., 1988 (milho graúdo); Klein et al., 1988 (milho graúdo); Klein et al., 1988 (milho graúdo); Fromm et al., 1990 (milho graúdo); e Gordon-Kamm et al., 1990 (milho); Svab et al., 1990 (cloroplasto de tabaco); Koziel et al., 1993 (milho graúdo); Shimamoto et al., 1989 (arroz); Christou et al., 1991 (arroz); Pedido de Patente Europeia EP 0 332 581 (*Dactylis glumerata* "orchardgrass" e outras Pooideae); Vasil et al., 1993 (trigo); Weeks et al., 1993 (trigo). Em uma modalidade, o método de transformação de protoplasto para milho é empregado (Pedido de Patente Europeia EP 0 292 435, Patente U. S. No. 5.350.689).

Em uma outra modalidade, uma sequência de nucleotídeos da presente invenção é diretamente transformada no genoma de plastídio. A tecnologia de transformação de plastídio está extensivamente descrita nas Patentes U.S. Nos. 5.451.513, 5.545.817, e 5.545.818, no pedido PCT no. WO 95/16783, e em McBride et al., 1994. A seguir à transformação, as plantas são preferencialmente selecionadas usando um marcador selecionável dominante incorporado no vetor de transformação. Tipicamente, esses marcadores vão conferir resistência antibiótica ou herbicida às plantas transformadas e a seleção dos transformantes pode ser completada expondo as plantas a concentrações apropriadas de antibiótico ou herbicida.

Depois de transformadas as células vegetais ou as plantas são selecionadas e crescidas até à maturidade, sendo identificadas as plantas evidenciando as características de interesse. A característica pode ser qualquer uma das características descritas acima. Adicionalmente, para confirmar que a característica de interesse é devido à expressão do polinucleotídeo de interesse introduzido sob controle do nucleotídeo regulador, de acordo com a invenção, os níveis de expressão ou de atividade do polipeptídeo ou polinucleotídeo de interesse podem ser determinados analisando a expressão mRNA usando Northern blots, RT-PCR ou microarranjos, ou expressão da proteína usando ensaios de imunoblots ou de Western blots ou de atividade enzimática.

Portanto a invenção se relaciona com células e tecidos vegetais, com plantas derivadas dessas células e tecidos, respectivamente, com material vegetal, com a progênia e as sementes derivadas dessas plantas, e com produtos agrícolas incluindo produtos vegetais processados com propriedade melhoradas obteníveis, por exemplo, por qualquer um dos métodos de transformação descritos abaixo.

Uma vez que o cassete de expressão, de acordo com a presente invenção e como aqui descrito compreendendo uma sequência reguladora, de acordo com a invenção, em associação com um polinucleotídeo de interesse, tenha sido transformado em uma espécie de planta específica, pode ser propagada naquela espécie ou movida para outras variedades das mesmas espécies, incluindo particularmente variedades comerciais, usando técnicas de hibridização tradicionais. Plantas preferidas da invenção incluem gimnospêrmicas, monocotiledôneas, e dicotiledôneas, especialmente plantas de cultivo agronomicamente importantes, tais como arroz, trigo, cevada, centeio, colza, milho, batata, cenoura, batata doce, beterraba sacarina, feijão, ervilha, chicória, alface, couve, couve-flor, brócolos, nabo, rábano, espinafres, espargos, cebola, alho, beringela, pimento, aipo, cenoura, cabaça, abóbora, aboborinha, pepino, maçã, pêra, marmelo, melão, ameixa, cereja, pêssego, nectarina, damasco, morango, uva, framboesa, amora, ananás, abacate, papaia, manga, banana, soja, tabaco, tomate, sorgo e cana-de-açúcar.

As propriedades genéticas modificadas nas plantas transgênicas descritas acima são passadas por reprodução sexuada ou crescimento vegetativo e podem assim ser mantidas e propagadas nas plantas da progenia. Geralmente a referida manutenção e propagação faz uso de métodos agrícolas conhecidos desenvolvidos para atender a fins específicos tais como lavoura, sementeira ou colheita. Processos especializados tais como tecnologias hidropônicas ou de estufa podem também ser aplicados. O uso das propriedades genéticas vantajosas das plantas transgênicas, de acordo com a invenção, pode ainda ser feito no cruzamento de plantas que visa o desenvolvimento de plantas com propriedades melhoradas tais como tolerância a pragas, herbicidas, ou estresse, valor nutricional melhorado, aumento do

rendimento, ou estrutura melhorada causando menos perdas de instalação ou quebra. As várias etapas de cruzamento são caracterizadas pela correta intervenção humana tal como selecionar as linhas a cruzar, dirigir a polinização das linhas parentais, ou selecionar plantas de progenia adequadas. Dependendo das propriedades desejadas, são tomadas diferentes medidas de cruzamento. As técnicas relevantes são bem conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas a, hibridização, endogamia, retrocruzamento de reprodução, criação de múltiplas linhas, mistura de variedade, hibridização interespecífica, técnicas aneuploides, etc. As técnicas de hibridização incluem também a esterilização de plantas para produzir plantas masculinas ou femininas estéreis por meios mecânicos, químicos ou bioquímicos. A polinização cruzada de uma planta masculinamente estéril com pólen de uma linha diferente assegura que o genoma da planta masculinamente estéril, mas femininamente fértil vá obter uniformemente propriedades de ambas as linhas parentais. Deste modo, as plantas transgênicas, de acordo com a invenção, podem ser usadas para cruzamento de linhas de plantas melhoradas que, por exemplo, aumentam a eficácia dos métodos convencionais tais como tratamento herbicida ou pesticida ou permitem dispensar os referidos métodos devido às suas propriedades genéticas modificadas. Alternativamente novas culturas com tolerância melhorada a estresse podem ser obtidas em que, devido ao seu "equipamento" genético otimizado, produzem produtos colhidos de melhor qualidade do que os produtos que não são capazes de tolerar condições de desenvolvimento adversas comparáveis.

Em uma modalidade da invenção, a planta foi transformada com e expressa uma sequência de nucleotídeos codificando polipeptídeo ou proteína codificando um produto polipeptídico exibindo atividade inseticida, particularmente uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa, onde a sequência de nucleotídeos não é transcrita de forma significativa. Deste modo, essencialmente não ocorre nenhuma expressão no tecido do pólen e/ou do pendão e somente

quantidades residuais de produto de expressão, caso haja, podem ser detectadas nos referidos tecidos, a qual não é suficiente para o produto de expressão cumprir a sua função biológica visada nos referidos tecidos ou para exibir qualquer efeito tóxico quer nos insetos que se alimentem nesses tecidos quer na própria planta.

Em especial, a concentração do produto polipeptídico expresso a partir do polinucleotídeo de interesse codificando proteínas nos tecidos do pólen e/ou do pendão é de modo que nenhuma atividade inseticida possa ser detectada num ensaio padrão de alimentação de insetos. Em uma modalidade da invenção, a concentração do produto de expressão no pólen é inferior de um nível básico de cerca de 10 ng/mg de proteína solúvel, particularmente de cerca de 5 ng/mg de proteína solúvel, mais particularmente de cerca de 3 ng/mg de proteína solúvel, mas especialmente de cerca de 2 ng/mg de proteína solúvel ou inferior.

A invenção fornece ainda métodos para preparar cassetes de expressão compreendendo a sequência reguladora de acordo com a invenção compreendendo ligar um polinucleotídeo expressável codificando um polipeptídeo ou uma proteína de interesse com a sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito para obter um construto de expressão, em que o polinucleotídeo de interesse é operavelmente ligado ou associado a uma sequência reguladora, de modo que a expressão do polipeptídeo ou da proteína de interesse seja mediada pela sequência reguladora de acordo com a invenção resultando na expressão do referido polipeptídeo ou proteína de interesse em essencialmente todos os tecidos vegetais, mas exclui essencialmente a expressão nos tecidos das estruturas reprodutoras da planta, particularmente nos tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com um método para produzir uma planta transgênica expressando uma sequência de DNA de interesse em tecido que não de pólen, mas não ou substancialmente não é expresso nos tecidos do pólen e/ou do pendão, compreendendo

a) transformar um cassete de expressão, de acordo com a invenção, e como aqui descrito em uma célula vegetal que compreende uma sequência de nucleotídeos reguladora, em que pelo menos parte da qual tem uma função de iniciação da transcrição que medeia a expressão de um polinucleotídeo de interesse codificando uma proteína operavelmente associado na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen e/ou do pendão, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa; e

b) regenerar uma célula vegetal transformada na etapa a) em uma planta.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com um método de controle de pragas-alvo de insetos que se alimentam nos tecidos vegetativos da planta tais como folhas, caules e raízes e/ou nos tecidos reprodutores tais como espiga, mas protegendo as pragas não-alvo que se alimentam de pólen compreendendo

a) crescer uma planta, de acordo com a invenção, e como aqui descrito em uma área que está infestada com a praga-alvo;

b) expressar um polipeptídeo ou uma proteína que é capaz de controlar a referida praga-alvo sob o controle de uma sequência reguladora de acordo com a invenção e como aqui descrito.

Em uma modalidade, a invenção se relaciona com um método para proteger os tecidos reprodutores de uma planta, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão contra danos causados pela expressão nos referidos tecidos de um polipeptídeo ou proteína de interesse compreendendo

a) crescer uma planta, de acordo com a invenção, e como aqui descrito;

b) expressar um polipeptídeo ou uma proteína de interesse sob o controle de uma sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

Em uma modalidade, a presente invenção se relaciona com o uso de uma sequência reguladora, de acordo com a presente invenção, e como aqui divulgado para controlar pragas-alvo de insetos que se alimentam

nos tecidos vegetativos da planta tais como as folhas, caules e raízes e/ou nos tecidos reprodutores tais como a espiga, mas protegendo as pragas não-alvo que se alimentam de pólen compreendendo

a) crescer uma planta, de acordo com a invenção, e como aqui descrito em uma área que está infestada com a praga-alvo;

b) expressar um polipeptídeo ou uma proteína que é capaz de controlar a referida praga-alvo sob o controle de uma sequência reguladora, de acordo com a invenção, e como aqui descrito.

Em uma modalidade, a presente invenção se relaciona com o uso de uma sequência reguladora, de acordo com a presente invenção, e como aqui divulgado para proteger os tecidos reprodutores de uma planta, particularmente os tecidos do pólen e/ou do pendão contra danos causados pela expressão nos referidos tecidos de um polipeptídeo ou proteína de interesse compreendendo expressar o referido polipeptídeo ou proteína de interesse sob o controle de uma sequência reguladora de acordo com a invenção e como aqui descrito.

EXEMPLOS

Os Exemplos seguintes fornecem modalidades ilustrativas. À luz da presente divulgação e ao nível geral dos versados na técnica, os versados consideram que os seguintes Exemplos são entendidos para serem somente exemplificativos e as numerosas variações, modificações, e alterações podem ser empregadas sem se afastar do escopo do assunto presentemente reivindicado.

Todas as manipulações e técnicas necessárias para construir e propagar cepas descritas nesta invenção são conhecidas dos versados na técnica. Os detalhes técnicos estão descritos e.g. em Ausubel et al 1995; Sambrook, J, 2001 e Miller, J.H. 1992 e em publicações relevantes citadas nesta invenção.

Exemplo 1: Expressão de Não Pólen

Exemplo 1.1 Identificação de ZmABP3

Em um experimento de perfil de expressão em uma série de desenvolvimento de milho graúdo foi pesquisada em um chip Affymetrix de *Zea*

mays (Zm80K) para as sondas que deram fortes sinais em todas as amostras, mas nenhum ou substancialmente nenhum nas amostras de pólen. Todos os tecidos verdes e amostras de raiz foram diretamente comparados com os do pólen, e sondas representando polinucleotídeos que não encontraram o perfil de expressão desejado foram eliminadas. A análise produziu dois conjuntos de resultados. O primeiro conjunto contém 36 sondas representando polinucleotídeos que foram altamente expressos em todas as amostras de tecido, mas muito pouco no pólen. O segundo conjunto contém 10 sondas representando polinucleotídeos que são altamente expressos em todas as amostras de tecido, mas não dão sinal no pólen. O alinhamento da sequência de sondas com conjunto de dados de cDNA do milho mostraram que todas as 46 sondas representam genes do milho genuínos. As 10 sondas de topo são aquelas com o sinal mais forte de todos os tecidos de não pólen e sem sinal no pólen (ver Tabela A).

Aplicar critérios adicionais incluindo a determinação da disponibilidade de DNA genômico (gDNA) e das sequência cDNA para cada ligação produziu Zm07728_s_at como o candidato de topo que cumpriu todos os requisitos de promotores de desenvolvimento. A análise da literatura revelou que esta sonda representa o gene codificando proteínas de ligação a actina 3 (ZmABP3) que é um membro de uma pequena família de genes que foi previamente caracterizada (Lopez et al., 1996). O produto de genes tem sido também chamado fator de despolimerização de actina 3. Lopez et al (1996) confirmam na figura 3 que ZmABP3 é altamente expresso na maior parte dos tecidos da planta examinados, exceto nas amostras de pólen.

Lopez et al (1996) mostram também por análise de southern que existem dois genes ABP3 no genoma do milho. O ZmABP3 cDNA reportado tem o Acesso do GenBank X97726, e corresponde ao Acesso TC248585 de TIGR. Este gene foi designado ZmABP3-A. Os dois genes ZmABP3 estão representados no milho graúdo (Zm80K) Chip Affymetrix: ZmABP3-A correspondente à sonda Zm007595_at e ZmABP3-B correspondente a Zm07728_s_at. A sequência 'Zm07728_s_at' foi usada para identificar o TC248588 na base de dados TIGR, e MAIZE 974.CB1 num conjunto

de base de dados de cDNA de milho. Foram também identificadas as sequências de gDNA MAGI_93606, MAGI_93607, AZM4_39177, ZmGSStuc11-12-04.2725.1, ZmGSStuc11-12-04.2725.2 e CC463190. As proteínas codificando cDNAs ZmABP3-A e ZmABP3-B são idênticas a todos os resíduos, exceto um. A expressão de dados de perfis indicam que ZmABP3-B é altamente expressa na maior parte dos tecidos da planta, mas excluindo essencialmente os tecidos do pólen, de modo que nenhum produto de expressão esteja presente nos referidos tecidos de forma significativa. ZmABP3-A não é tão altamente expressa.

A SEQ ID NO: 16 mostra que o mRNA ZmABP3-B é codificado nos 3 éxons. As duas sequências intervenientes (íntrons) são delimitadas pelos esperados nucleotídeos de fronteira GT...AG.

Mais especificamente, SEQ ID NO: 16 divulga o design do cassete de expressão ZmABP3. Os componentes ZmABP3 reguladores a serem incluídos no construto são 2,3 kb de sequência 5' (prZmABP3-01) que contém 1,1 kb de sequência 5' não transcrita, 0,25 kb de 5'-UTR e 0,98 kb representando íntron 1 ZmABP3-B; e 1,013 kb da sequência 3' (tZmZBP3-01) que começa mesmo após o códon de paragem da tradução ABP3-B. Este inclui cerca de 0,3 kb de 3'-UTR e 0,7 kb de sequência não transcrita.

Tabela A mostra um sumário das 10 sondas candidatas de topo representando polinucleotídeos com um alto nível de expressão em todos os tecidos de milho graúdo e sem sinal de expressão no pólen

Nome da sonda	Descrição do gene de referência	Expressão no pólen	Média de Expressão (todos os tecidos)	Hit TIGR de *Zea mays*
AF032370_at	"perfil em *Zea mays*(PRO4)mRNA, cds completo"	ausente	4208	TC269677
Ctrl_ZmU45855-3_at	De 808 até 1307 de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase GAPC2 (gpc2)mRNA, cds completo	ausente	4275	TC269361
Zm001747_s_at	Semelhante a CAA63903.1 *Pennisetum glaucum*; choque térmico de proteína 17,9; mRNA de *P. glaucum* para proteína de choque térmico, HSP 17,9	ausente	4945	TC268849
Zm005803_s_at	Semelhante a AAB99745.1 *Triticum aestivum*, HSP70; *Triticum aestivum* 70kDa proteína de choque térmico, chaperone molecular"	ausente	4091	TC247918
Zm007728_s_at	Semelhante a SW:ADF3_MAIZE Q41764 *Zea mays* (milho graúdo) fator de despolimerização de actina 3(adf3) (zmabp3)(zmadf3).	ausente	4805	TC248588

Tabela A - continuação-

Nome da sonda	Descrição do gene de referência	Expressão no pólen	Média de Expressão (todos os tecidos)	Hit TIGR de *Zea mays*
Zm009722_s_at	Semelhante a BAC22420.1 de *Orysa sativa* (grupo cultivar japonica); DNA genômico de *Orysa sativa* (grupo cultivar japonica), cromossoma 7, clone PAC:P0453E03; contém ESTs C96778(C10671),D22278(C10671) desconhecido	ausente	3306	TC248975
Zm015335_s_at	Semelhante a SW:RS5A_ARATH Q9zut9 de *arabidopsis thaliana* (agrião orelha-de-gato). Proteína ribossomal 40s s5-1.2/2003	ausente	3598	TC269022
Zm021004_s_at	"Semelhante a AAD39835.1 de *Arabidopsis thaliana;* si-RanBP proteina de ligaçao Ran; mRNA (SiRanBP) de proteina de ligaçao Ran *Arabidopsis thaliana*, cds comple-to; homolog atranbp1a"	ausente	3092	TC259986
Zm058948_s_at	Sem descrição	ausente	4337	TC270333
Zm061393_s_a	Sem descrição=sintase de sacarose	ausente	6509	TC258905

Exemplo 1.2 *Construção de Cry1AbG6*

Cry1AbG6 (2814 pb) é uma versão modificada do gene de comprimento total Cry1Ab (pNOV1321, 3546bp). A sequência Geiser (81 pb de 4398-4478 em pNOV1321) e 3'-terminal (651bp de 4908-5558 em pNOV1321) foram deletadas.

A sequência Cry1AbG6 foi construída a partir de pNOV1321 (vetor fonte para o gene Cry1Ab de comprimento total) como segue: O DNA de plasmídeo pNOV1321 foi cortado com BamHI/SacI. O gene Cry1Ab de comprimento total (3546bp, chamado Michigan) foi purificado em gel e ligado ao vetor de expressão pTrcHisB (Em tecnologias de vida vitrogen, Cat# V36020), que foi cortado com BamHI/SacI. Este construto foi chamado de Michigan-pTrcHisB. A sequência Geiser (81bp) foi deletada de Michigan-pTrcHisB por PCR de sobreposição com os seguintes iniciadores:
5' Bfr1 (5'-cctggtggagtgcttaagcgacgagttctgcctgg-3'), (SEQ ID NO: 83)
3' Xba1 (5'-gggcttctcctccaggaactctagattgcccaggcg-3'), (SEQ ID NO: 84)
5'Gfix (5'-catcggcaagtgccaccacagccaccacttcagcctg-3') (SEQ ID NO: 85) e
3'Gfix (5'-gctgtggtggcacttgccgatggggctggg-3') (SEQ ID NO: 86).

O produto A de PCR foi feito usando PCR de alta fidelidade com Michigan-pTrcHisB como modelo, e os iniciadores 5' Bfr1 e 3' Gfix. O produto B de PCR foi feito usando PCR de alta fidelidade com Michigan-pTrcHisB como modelo, e os iniciadores 5'Gfix e 3'Xba1. O PCR final usou os produtos A e B como modelos, e os iniciadores 5'Bfr1 e 3'Xba1. A banda de PCR final foi digerida com AflII/XbaI e purificada em gel. Este fragmento foi ligado a Michigan-pTrcHisB que também tinha sido digerido com XbaI/AflII. O produto de DNA recombinante correto foi identificado por análise de digestão com AflII/XbaI. Este construto foi chamado de Cry1Ab-G.

Um segundo produto de PCR foi feito por PCR de alta fidelidade usando pNOV1321 como um modelo, e iniciador 5'1Ab5XbaI (5'-gcccgcctgggcaatctagagttcctggaggag-3') descrito na SEQ ID NO: 87, e o iniciador 3'1Ab3d6 (5'-gcgagctcctagatgcggccctcgagttcctcgaaga-3') descrito na SEQ ID NO: 88. O produto de PCR foi digerido com XbaI/SacI depois ligado a Cry1Ab-G que foi também digerido com XbaI/SacI. O produto DNA recombi-

nante correto foi identificado usando análise de restrição BamHI/SacI. Este construto foi chamado de Cry1AbG6.

A sequência Cry1AbG6 foi submetida à mutagenêse QuikChange para remover um sítio NcoI inteiro. Os 25 µL da reação continham

1 µL de modelo Cry1AbG6,

2,5 µL 10X de tampão QuikChange,

1 µL de mistura dNTP QuikChange,

1 µL de cy2' (5'-Pccctgtacggcacgatgggcaacgctgca-3'; SEQ ID NO: 89) a 20 µM,

0,75 µL de solução Quik e

1 µL de DNA polimerase QuikChange.

O programa de termociclagem foi 95°C durante 5 minutos seguido por 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto e 65°C durante 20 minutos. O produto foi processado como descrito pelo fabricante (Stratagene) e sequenciado completamente.

A sequência de codificação Cry1AbG6 foi amplificada a partir do modelo de plasmídeo mutagenizado, acima, em uma reação de DNA polimerase em 50 µL de Pfu turbo (Stratagene) contendo

5 µL de modelo,

5 µL de tampão Pfu 10X,

1 µL de mistura dNTP a 10 mM,

1 µL de cy1 (5'-atatatccaccatggacaacaaccccaaca-3'; SEQ ID NO: 90) 20 µM,

1 µL de cy2 (5'-tatatagagctcctagatgcggccctcgagt-3'; SEQ ID NO: 91) 20 µM e

1 µL Pfu DNA polimerase turbo.

O programa de termociclagem foi 95°C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto e 72°C durante 7 minutos. A etapa final de extensão foi 72°C durante 15 minutos. O produto da reação 2,8 kb foi purificado em gel de agarose TAE a 1%, e o DNA foi extraído usando o Método de extração de DNA Qiaprep. O DNA recuperado foi digerido com NcoI/SacI, depois ligado ao vetor pNOV6901 que

foi também digerido com NcoI/SacI. Esta operação substitui a sequência de codificação GUS em pNOV6901 com Cry1AbG6. A sequência Cry1AbG6 é dada na SEQ ID NO: 15.

Exemplo 1.3 *Construção do cassete de expressão ZmABP3*

Uma estratégia de design inclusivo foi usada para desenvolver o cassete de expressão ZmABP3. O cassete contém 2,3 kb de sequência 5' que consiste em 1,1 kb de sequência 5' não transcrita, 0,25 kb de 5'-UTR e 0,98 kb representando íntron 1 ZmABP3. O códon de iniciação da tradução natural foi silenciado com vista a movê-lo para o segundo éxon. O cassete de expressão contém também 1,013 kb de sequência 3' que começa logo a seguir ao códon de paragem da tradução ABP3. Isto inclui cerca de 0,3 kb de 3'-UTR e 0,7 kb de sequência não transcrita, e funciona como terminador transcricional e sinal de poliadenilação.

O terminal ZmABP3 foi amplificado a partir do modelo gDNA de milho graúdo em uma reação de DNA polimerase em 50 µL de Proofstart (Qiagen) contendo

10 µg de gDNA,

5 µL de tampão 10X Proofstart,

1,5 µL de mistura dNTP a 10 mM,

2,5 µL de P3 (5'-tatatagagctcgcatcatgatcatgcatcatggact-3'; SEQ ID NO: 9) a 20 µM,

2,5 µL de P4 (5'-atatatactagtggcgcgccacactttctgtcgcatgtgatttgca-3'; SEQ ID NO: 10) a 20 µM,

10 µL de solução Q e

2 µL de DNA polimerase Proofstart.

O programa de termociclagem foi 95°C durante 5 minutos, seguido por 45 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 1 minuto e 72°C durante 4 minutos. O passo final de extensão foi 72°C durante 15 minutos. O 1 kb de produto de reação foi purificado em gel de agarose TAE a 1%, e o DNA foi extraído usando Método de extração de DNA Qiaprep. O DNA foi precipitado em etanol e recuperado em 4 µL de ddH_2O, depois clonado em um vetor pCR4-TOPO-Blunt.

O terminal ZmABP3 foi modificado para remover um sítio de restrição interna NcoI usando o kit para mutagênese Multissítio Stratagene QuikChange. Os 25 µL de reação continham

1 µL de pCR4-TOPO-ZmABP3-terminal,

2,5 µL de tampão 10X QuikChange,

1 µL de mistura dNTP QuikChange,

1 µL de Tnco (5'-Pgtaaaaaaaggtcccttggctcccagaaga-3'; SEQ ID NO: 11) a 20 µM,

1 µL de T2 (5'-Pcaatgtgttagactgacgtg-3'; SEQ ID NO: 12) a 20 µM,

0,75 µL de solução Quik e

1 µL QuikChange DNA polimerase.

O programa de termociclagem foi 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto e 65°C durante 15 minutos. O produto foi processado como descrito pelo fabricante (Stratagene) e completamente sequenciado. A sequência ZmABP3-terminal é mostrada na SEQ ID NO: 14.

O promotor ZmABP3 foi amplificado do modelo gDNA de milho graúdo em uma reação de DNA polimerase a 50 µL Hotstart (Qiagen) contendo

10 µg de gDNA,

25 µL de 2X Mistura Hotstart Master,

1,25 µL de P1 (5'-atatatgcatgcggcgcgccgaaagtagcaaacaacaggttcatgtgcac-3'; SEQ ID NO: 1) a 20 µM,

1,25 µL de P2 (5'-tatataccatggtgggtttgcctgcgaccacaagttca-3'; SEQ ID NO: 2) a 20 µM,

10,5 µL de solução Q e

2 µL de $MgCl_2$ a 25 mM.

O programa de termociclagem foi 95°C durante 15 minutos, seguido por 45 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 64°C durante 1 minuto e 72°C durante 5 minutos. A etapa final de extensão foi 72°C durante 15 minutos. Os 2,3 kb do produto de reação foi purificado em gel de agarose TAE a 1%, e o DNA foi extraído usando Qiaprep Método de extração de DNA. O DNA

foi precipitado em etanol e recuperado em 4 µL de ddH_2O, depois clonado no vetor pCR4-TOPO.

O promotor ZmABP3 foi modificado em uma série de reações QuikChange como descrito acima usando os seguintes oligonucleotídeos:

Patg (5'-cagctcgcccgagttggtaaggcccccct-3'; SEQ ID NO: 3),

Pnco (5'-acagattagtccatcgcccacggt-3'; SEQ ID NO: 4),

ADPc-1 (5'-agccctgtccatgacggcccaagcaac-3'; SEQ ID NO: 5),

ADPc-2 (5'-agtagcaattcggtaggcacaggcac-3'; SEQ ID NO: 6),

ADPc-4 (5'-tctatggtctgcgaggtgcggtggc-3'; SEQ ID NO: 7), e

adp3-a (5'-gtccccttcttcgccgcgccagctcgc-3'; SEQ ID NO: 8).

A sequência de promotor ZmABP3 é mostrada em SEQ ID NO: 13.

O terminal ZmABP3 foi ligado ao vetor pNOV6901-Cry1AbG6 (do Exemplo 2) como um fragmento SacI/SpeI. O Promotor ZmABP3 foi subsequentemente ligado ao vetor como um fragmento SphI/NcoI. Isto produziu o conjunto ZmABP3-Cry1AbG6, mostrado na SEQ ID NO: 37. O cassete de expressão completa ZmABP3-Cry1AbG6 foi mobilizado para o vetor binário, pNOV6900, como um fragmento AscI. Estes construtos, ZmABP3-Cry1AbG6-6900 e ZmABP3-Cry1AbG6-binário intensificado, são mostrados na SEQ ID NOS: 38 e 39, respectivamente. A única diferença entre estes vetores é a presença do intensificador dual CaMV-FMV no binário ZmABP3-Cry1AbG6 melhorado. Ambos foram mobilizados para o milho via transformação mediada por *Agrobacterium*.

Exemplo 1.4 *Construção de ZmABP3-AmCyan*

A sequência de codificação Cry1AbG6foi foi excisada do conjunto ZmABP3-Cry1AbG6 como um fragmento NcoI/SacI. Foi substituída pela sequência codificando o gene repórter AmCyan que foi excisada do plasmídeo 13718 como um fragmento NcoI/SacI. Isto produziu o construto do conjunto ZmABP3-AmCyan mostrado na SEQ ID NO: 40. O cassete de expressão ZmABP3-AmCyan foi mobilizado para um vetor binário, pNOV6900, como um fragmento AscI. Este construto, ZmABP3-AmCyan-binário, é mostrado na SEQ ID NO: 41. Foi mobilizado para o milho graúdo via transformação mediada por *Agrobacterium*.

Exemplo 1.5 *Expressão de ZmABP3-AmCyan em milho* graúdo *transgênico*

Vários eventos de milho graúdo transgênico contendo o cassete de expressão ZmABP3-AmCyan foram produzidos. Aqueles contendo uma cópia única do transgene e nenhuma sequência de vetores não pretendidos foram analisados. Todos os eventos transgênicos acumularam AmCyan transcrito no tecido das folhas (dados não mostrados). Vários tecidos de um evento representativo foram examinados por acumulação de AmCyan transcrito. O RNA total foi preparado usando o sistema de isolamento de RNA total "Plant RNAeasy" (Qiagen). O RNA total do pólen foi preparado usando o método descrito por Shirzadegan et al (1991). A qualidade da preparação foi avaliada por espetrofotometria de UV, e 10 µg do RNA total por amostra foram redissolvidos num gel de formaldeído a 1% e depois transferido para membrana Nytran SuPerCharge seguindo o protocolo recomendado (Schleicher & Schuell). O blot foi hibridado com uma sonda de DNA AmCyan ^{32}P-marcada iniciada de modo randomizado usando condições de elevado rigor. Os resultados mostram claramente que ZmABP3 promove a transcrição no tecido do pendão, folha, sedas, espiga e raiz, mas não promove a transcrição no pólen.

Exemplo 1.6 *Expressão de ZmABP3-Cry1AbG6 em milho* graúdo *transgênico*

Vários eventos de milho graúdo transgênico contendo o cassete de expressão ZmABP3-Cry1AbG6 foram produzidos. Aqueles contendo uma única cópia do transgene e nenhuma sequência vetor não pretendida foram analisados. Os eventos T0 foram testados quanto à atividade inseticida contra a lagarta da espiga do milho duas vezes durante o decurso do desenvolvimento. As primeiras amostras foram tomadas a V2-V4, e as segundas amostras foram tomadas a V7-V9. Discos de folha das pontas das folhas inferiores foram excisados e colocados sobre papel Whatman humedecido com água em placas de petri de 47 X 10 mm. Dez a vinte larvas L1 de lagartas da espiga do milho ou da broca do milho Europeu foram adicionadas a cada placa, e foram incubadas durante 48 horas a 28°C. Os discos de folhas

foram depois avaliados quanto aos danos causados pelos insetos. As amostras sem danos visíveis nas folhas e mortalidade absoluta foram registados como positivos, e aqueles com danos visíveis foram negativos. Os dados obtidos mostram que foram identificados vários eventos transgênicos com atividade contra ambos os insetos.

Foi também medida a acumulação de proteína Cry1AbG6 nas plantas T0 usando o ensaio imunossorbente ligado a enzima (ELISA) com um padrão Cry1Ab totalmente truncado. O primeiro ensaio foi feito em tecido de folhas de plantinhas, amostradas 1-2 semanas após transferência para o solo. O segundo ensaio foi feito em tecido de folhas das plantas maduras, amostradas mesmo antes da transição para desenvolvimento reprodutivo. Os dados na TABELA B mostram a faixa de proteína Cry1AbG6 acumulada nas plantas com atividade inseticida. Os dados indicam que as plantas requerem perto de 50 ng (ou mais) de proteína Cry1AbG6/mg de proteína extraível para terem atividade inseticida.

TABELA B mostra o controle de insetos característicos das estufas de crescimento de plantas.

Nº do Evento	Descrição do Cassete	Cry1AbG6 ng/mg de proteína extraível)		Atividade da lagarta da espiga do milho		Atividade da ECB
		Plantinhas	adultos	V2-V4	V7-V9	V7-V9
1	ABP3-Cry1Abg6	63	79	+	+	+
2	ABP3-Cry1Abg6	54	56	+	+	+
3	ABP3-Cry1Abg6	85	108	+	+	+
4	ABP3-Cry1Abg6	67	94	+	+	+
5	ABP3-Cry1Abg6	45	83	+	+/-	+/-
6	ABP3-Cry1Abg6	68	120	+	+	+
7	ABP3-Cry1Abg6	133	159	+	+	+
8	ABP3-Cry1Abg6	96	46	+	+	+
9	ABP3-Cry1Abg6	138	101	+	+	+

TABELA B -continuação-

Nº do Evento	Descrição do Cassete	Cry1AbG6 ng/mg de proteína extraível)		Atividade da lagarta da espiga do milho		Atividade da ECB
		Plantinhas	adultos	V2-V4	V7-V9	V7-V9
10	ABP3-Cry1Abg6	131	100	+	+	+
11	ABP3-Cry1Abg6	94	65	+	+	+
12	ABP3-Cry1Abg6	111	59	+	+	+
13	ABP3-Cry1Abg6	139	60	+	+	+
14	ABP3-Cry1Abg6	121	81			
15	ABP3-Cry1Abg6	66	55	+	+	+
16	ABP3-Cry1Abg6	130	95	+	+	+

O tecido das folhas das plantas T0 foi ensaiado quanto à proteína Cry1AbG6 através de ELISA usando proteína Cry1Ab truncada como padrão, a atividade da Lagarta da Espiga do Milho e a atividade da Broca do Milho Europeu (ECB). O estágio de desenvolvimento da planta quando amostrada é indicado no topo de cada coluna. O tecido de folhas mais velhas (inferiores) foi amostrado. Para os ensaios com insetos um (+) indica sem danos visíveis na folha e a completa e absoluta mortalidade dos insetos. Os danos visíveis nas folhas produzem um escore de (-).

Exemplo 1.7 Eficácia dos eventos ZmABP3-Cry1AbG6 na broca do milho Europeu no campo

Os estudos de campo da eficácia para a ECB (Broca do milho Europeu) foram conduzidos em Stanton, MN (SMN) e Bloomington, IL (BIL) durante a época de crescimento de 2006. Híbridos quase-isogênicos, compreendendo os eventos ABP3-Cry1AbG6 listados na TABELA C, Bt11, e um controle não híbrido transgênico foram testados. O design experimental foi de blocos completos randomizados com três réplicas em cada local. Uma parcela consistiu de uma longa linha de 5,31 m contendo 25 plantas, com 0,76 m de espaçamento entre linhas.

TABELA C mostra o desempenho de milho graúdo ZmABP3-Cry1AbG6 em estudos de campo.

Local de Ensaio Tipo de Ensaio		MG371 BIL ECB				MG331 SMM ECB			
		ECBKN	ECBSN		ECBLR	ECBKN	ECBSN		ECBSN
Número do Evento	Descrição do cassete	Alimentação nas Folhas Classi-ficação	CEBSN Haste (cm)	Alimentação na Espiga (cm)	Alimentação no Talo (cm)	Alimentação nas Folhas Classificação	CEBSN Haste (cm)	Alimentação na Espiga (cm)	Alimentação no Talo (cm)
1	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,42	0,00	1,1	0,00	0,00	0,30
2	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,42	0,08	1,0	0,00	0,15	0,10
3	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,25	0,08	1,0	0,00	0,00	0,80
4	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,57	0,00	1,0	0,10	0,51	1,10
5	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,25	0,04	1,0	0,00	0,07	0,20
6	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,08	0,00				
7	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,31	0,00	1,1	0,10	0,45	0,80
8	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,04	2,00	0,08	1,1	0,00	0,00	0,30
9	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	0,92	0,00	1,3	0,00	0,00	0,10
10	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,42	0,04	1,2	0,00	0,00	0,40

TABELA C -continuação-

Local de Ensaio Tipo de Ensaio		MG371 BIL ECB				MG331 SMM ECB			
		ECBKN	ECBSN		ECBLR	ECBKN	ECBSN		ECBSN
Número do Evento	Descrição do cassete	Alimentação nas Folhas Classi-ficação	CEBSN Haste (cm)	Alimentação na Espiga (cm)	Alimentação no Talo (cm)	Alimentação nas Folhas Classificação	CEBSN Haste (cm)	Alimentação na Espiga (cm)	Alimentação no Talo (cm)
11	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,13	1,17	0,00	1,0	0,00	0,00	0,10
12	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,62	0,08	1,1	0,00	0,17	0,30
13	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,29	0,00	1,2	0,00	0,00	0,20
14	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,10	0,13	1,0	0,00	0,07	0,10
15	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,08	1,33	0,04	1,1	0,00	0,24	0,20
16	ABP3-Cry1Abg6	1,0	0,00	1,33	0,21	1,0	0,00	0,00	0,10
Bt11		1,0	0,00	2,75	0,00	1,3	0,00	0,00	0,00
Seleção negativa		7,0	0,21	3,00	4,67	4,3	0,40	5,80	13,50
Rep com dados		3	3	3	3	3	3	3	3

TABELA C -continuação-

Local de Ensaio Tipo de Ensaio	MG371 BIL ECB				MG331 SMM ECB			
	ECBKN	ECBSN		ECBLR	ECBKN	ECBSN		ECBSN
Número do Evento / Descrição do cassete	Alimentação nas Folhas Classi-ficação	CEBSN Haste (cm)	Alimentação na Espiga (cm)	Alimentação no Talo (cm)	Alimentação nas Folhas Classificação	CEBSN Haste (cm)	Alimentação na Espiga (cm)	Alimentação no Talo (cm)
Loc com dados	1	1	1	1	1	1	1	1
Design usado	RCB	RCB	RCB	RCB	RCB	RCB	RCB	RCB
LSD (5%) EE Geral		0,149	0,923	0,257	0,399	0,200	1,988	0,650
LSD (5%) Negativos Excluídos		0,158	0,936	0,255	0,397	0,181	0,505	1,391
CV %		242,21	38,47	72,14	20,10	292,75	138,76	120,87
Pro-babili-dade %		0,90	0,09	0,00	0,00	4,10	0,00	0,00

Foram elaborados dois estudos em Bloomington, IL (BIL) e Stanton, MN (SMN) em 2006. Vários eventos ZmABP3-Cry1AG6 foram comparados quanto às referência positiva e negativa representadas por Bt11 e Seleção Negativa, respectivamente.

Larvas de primeira fase de ECB foram produzidas a partir de uma colónia de laboratório seguindo os procedimentos definidos em Guthrie (1989) no laboratório de entomologia da Syngenta Seeds, Inc. em Slater, IA. Os ovos foram incubados a cerca de 28°C e aproximadamente 80% de umidade relativa, e os neonatos foram recolhidos para recipientes para incubação aproximadamente 6 horas após a eclosão. As larvas estavam saudáveis e vigorosas quando foram colocadas nas plantas como indicado pelo movimento.

Foram realizados dois tipos de aplicação de ECB: ECB1, aplicado aproximadamente nos estágios de folha V6–V8 e ECB2, aplicado no revestimento do pólen. As aplicações foram feitas com o Inoculador BioServe Davis usando 1 ml de grãos de espiga do milho por aplicação. Para ECB1 (primeira geração da infestação de ECB) um total de cerca de 150 larvas foram colocadas no verticilo de cada planta, em grãos de espiga de milho. Duas a quatro aplicações foram feitas, com um até seis dias entre cada aplicação. A primeira planta na linha não foi tratada, e depois até 10 plantas consecutiva foram infestadas.

Para ECB2 (infestação com segunda geração de ECB) um total de cerca de 200 larvas foram aplicadas por planta, colocadas na axila foliar da espiga e axila foliar diretamente acima ou abaixo da espiga, em grãos de espiga de milho. Quatro aplicações foram feitas, com um até seis dias entre cada aplicação. Até dez plantas consecutivas na extremidade oposta da linha a partir do tratamento ECB1 foram infestadas. A última planta na linha não foi tratada.

As seguintes observações foram registadas. Para ECB1, até oito plantas consecutivas infestadas na linha foram avaliadas quanto aos danos foliares de ECB (ECBLR na TABELA C) pelo menos 14 dias após a primeira infestação. A escala Guthrie de 1-9 (Guthrie et al. (1960) foi usada e um valor, a média das plantas avaliadas, foi registado para cada talhão. Para

ECB2, aproximadamente 45 dias após as plantas terem sido infestadas, até oito plantas consecutivas infestadas na extremidade oposta da linha a partir das avaliações ECB1 foram dissecadas para avaliar a haste da espiga, o núcleo da espiga, e do talo de alimentação, medindo o comprimento do túnel de alimentação (cm).

Os dados de ECB2 foram sujeitos à análise de variância apropriada para um design de blocos completos aleatório. Foram consideradas réplicas aleatoriamente enquanto que todos os outros efeitos foram considerados fixos. A separação média foi feita usando o procedimento de diferença mínima significativa (LSD), mas somente se o teste de F para as entradas for significativo ao nível de significância usual de 5%. Como não houve variabilidade entre os eventos nos dados de ECB1, uma análise de variância não foi feita para este caracterstica. Os dados e a análise estão sumariados na TABELA D. Em geral, os dados mostram que ZmABP3-Cry1ABG6 confere protecção contra ECB semelhante à observada no material Bt11.

A TABELA D mostra a quantidade de proteína Cry1AbG6 em tecido de milho transgênico. A folha mais jovem em desenvolvimento foi testada para Cry1AbG6 com ELISA em 5 estádios de desenvolvimento (V5-V6, V8, V10, R1, R3-R4) para cada planta. Cry1AbG6 foi também medido no pólen. Os eventos 5, 12, 15 e 16 expressam um construto ABP3-Cry1AbG6, e os Eventos A-D expressam o construto intensificado ABP3-Cry1Ab. Os dados mostrados são a média ± SD (n=8-10).

	V5-V6	V8	Estágio de desenvolvimento		R3-R4	Pólen
			V10	R1		
Evento 5	39(3,8)	38(2,7)	61(8,2)	75(5,3)	60(3,5)	1,5(0,14)
Evento 12	61(5,2)	32(1,9)	50(6,1)	44(5,1)	49(4,4)	1,4(0,39)
Evento 15	45(4,5)	45(4,8)	46(4,8)	38(7,4)	55(5,4)	1,0 (0,14)
Evento 16	58(5,4)	30(2,9)	47(5,3)	53(7,2)	44(4,6)	1,2(0,17)
Evento A	260(24)	190(22)	250(18)	200(21)	150(14)	1,3(0,19)
Evento B	260(22)	227(29)	240(30)	200(23)	150(76)	1,6(0,30)
Evento C	310(31)	210(26)	270(26)	150(15)	160(16)	1,9(0,31)
Evento D	310(30)	180(23)	240(15)	170(26)	150(18)	1,4(0,19)

Exemplo 1.8 *Uso do Cassete de expressão ZmABP3 para tolerância melhorara à seca em milho* graúdo

Uma forma desregulada de uma H^+-pirofosfatase (AtAVP1D) de *Arabidopsis* mostrou melhorar a tolerância à seca quando sobre-expressa em várias plantas (Gaxiola et al., 2001; Park et al., 2005). O desempenho melhorado é viabilizado por expressão elevada em toda a planta. Para demonstrar a utilidade da AtAVP1D para melhorar a tolerância à seca em milho graúdo, foi sintetizada uma sequência de codificação de milho graúdo otimizada. A sequência da gene sintético AtAVP1D é mostrada na SEQ ID NO: 16. Foi ligada ao cassete de expressão ZmABP3 como um fragmento NcoI/SacI. O mapa do vetor mostrado na SEQ ID: 42 ilustra o cassete de expressão ZmABP3-AtAVP1D. O cassete de expressão completa ZmABP3-AVP1D foi excisado do vetor de montagem como um fragmento SanDI/RsrII e ligada ao sítio RsrII do Vetor binário de *Agrobacterium*, 15289. Um mapa do construto é mostrado na SEQ ID NO: 43.

Exemplo 1.9 *Medição de Cry1AbG6 em tecido de milho*

Semente de T1 Híbrido (origem no ID5829/AX5707) para vários eventos ZmABP3-Cry1ABG6 foram produzidos na estação de campo da Syngenta em Bloomington, IL. Várias sementes foram germinadas em vasos de 2 polegadas. As plantinhas foram testadas em relação à zigozicidade de transgene, e somente os hemizigotos foram retidos. Um mínimo de 8 plantas por evento foi transplantado para vasos de 3 galões (2 polegadas)e crescidas em uma estufa com temperatura controlada. O tecido foliar de cada planta foi amostrado e ensaiado quanto à proteína Cry1AbG6 em 5 estádios de desenvolvimento, V5-V6, V8, V10, R1, e R3-R4 (Ritchie et al., 1997). O pólen foi também recolhido e analisado quanto à proteína Cry1AbG6.

Em cada estágio, o tecido foliar (menos a nervura central e gola, e a bainha) foi amostrado da folha mais nova em expansão. As amostras em duplicado foram pulverizadas em blocos de 96-poços. O pó foi suspendido em 500 µL-1 mL de tampão de extração (Borato de Sódio 0,1 M, 0,5% de Tween 20, 0,2% de Polivinilpirrolidona, 0,05% de Azida de Sódio, e 1X comprimidos de coquetel de inibidores da protease (Roche)). A misture foi clarifi-

cada por centrifugação e a proteína solúvel quantificada usando o ensaio BCA. O pólen fresco foi recolhido em tubos de Eppendorf de 1,5 mL. Três contas de vidro de 3 mm foram adicionadas a cada tubo e as amostras foram congeladas a -80°C. As amostras foram depois pulverizadas num oscilador horizontal a 600 rpm. A proteína foi extraída adicionando 500 µL-1 mL de tampão de extração e incubada a 4°C durante 30 minutos. As amostras foram clarificadas por centrifugação a 4°C, e a proteína solúvel em cada amostra foi quantificada por ensaio de BCA.

As amostras foram normalizadas quanto ao conteúdo em proteína e a Cry1AbG6 foi quantificada por ELISA usando Cry1Ab totalmente truncada como um padrão. Cada ponto de dados é a média das medidas em duplicado, tomadas em uma diluição diferente da proteína total. Os dados para cada evento são reportados como a média ± SD para todos os "irmãos".

Os resultados da TABELA D mostram que o cassete ZmABP3-Cry1AbG6 produz proteína Cry1AbG6 estável no tecido foliar ao longo do desenvolvimento. Alguma redução na proteína CryAbG6 é evidente dado que o tecido vegetativo começa a senescer (R3-R4). É também evidente o aumento de 3-5 vezes na acumulação de Cry1AbG6 em eventos que também têm o complexo duplo-intensificador CaMV-FMV. Finalmente, os dados mostram virtualmente nenhuma proteína Cry1AbG6 detetável no pólen. Em todos os eventos CryAbG6 acumula, em média, até menos de 1,5 ng/mg de proteína total solúvel. Para além disso, o complexo duplo-intensificador não influencia a acumulação de Cry1AbG6 no pólen; que é idêntica entre todos os eventos. Isto é consistente com os nossos dados mostrando que ZmABP3 não é transcrito no pólen (Exemplo 5). Nós concluímos que a Cry1AbG6 detetável no pólen foi igualmente produzida nas células-mãe de microsporos ou seus progenitores, e transportada para o pólen através da divisão celular.

EXEMPLO 2 Expressão de não pendão

Exemplo 2.1 Identificação de ZmABT

2.1.1 Experimento de perfil de expressão: Uma série de desen-

volvimento de milho graúdo em um chip Affymetrix (Zm80K) foi pesquisada para as sondas que deram fortes sinais em todas as amostras, mas um sinal fraco ou nenhum sinal nas amostras de pendão. Vinte e três sondas (23) foram identificadas representando polinucleotídeos que preenchem os critérios de expressão. Para melhor representar o diferencial de sinal de expressão entre as amostras de pendão e outras amostras de tecido, a proporção de sinal médio em relação a outras amostras e ao pendão foi calculada para cada sonda. Isto indica o diferencial de expressão entre o pendão e outras amostras. Qualquer sinal abaixo de 50 está no ruído experimental, que significa que o gene não pode ser transcrito ou é transcrito a um nível muito baixo. Para compreender p nível de expressão de cada gene representado por Sondas Candidatas, um segundo estudo de perfil de expressão foi necessário. Neste experimento os tecidos dos dois genótipos de milho foram hibridados com chip Affymetrix Zm80K. Em geral sinais acima de 1000 indicam elevada expressão e sinais acima de 10,000 indicam muito alta expressão.

2.1.2 Identificação de sondas candidatas: Duas sondas candidatas de topo foram identificadas. A sonda Zm033444_S_AT demonstra virtualmente nenhum sinal no pendão e um alto sinal noutros tecidos. Isto indica que o gene representado por Zm033444_S_AT não é expresso no pendão e é altamente expresso no resto da planta. Demonstra também o maior diferencial de expressão, 60 vezes maior no tecido que não de pendão. A sonda Zm040564_X_AT tem um sinal baixo no pendão jovem que aumenta gradualmente até um alto ou fortíssimo sinal. A força do sinal entre amostras de pendão e de não pendão difere em menos de 10 vezes. No entanto a força do sinal nas amostras não pendão é aproximadamente 10 vezes maior que em Zm033444_S_AT. Os dados da sequência indicam que nenhuma sonda corresponde a um gene caracterizado. Ambas as sondas identificam bons genes candidatos para desenvolvimento de promotores que conferem alta expressão no tecido de não pendão e pouca ou nenhuma expressão nos pendões. Dado o alto diferencial de sinal entre as amostras de pendão e não pendão, foi desenvolvido um cassete de expressão com base na sonda Zm033444_S_AT.

Tabela E: mostra um sumário dos sondas candidatas de topo representando polinucleotídeos com um alto nível de expressão em todos os tecidos de milho graúdo e baixo sinal de expressão no pendão

Sonda	Valor P	BH Valor Q	Indução Média em amostras não pendão	Pendão V9	pendão V12	pendão V15
Zm033444_s_at	0,00	0,00	60	16,2	10,2	132
Zm002990_s_at	0,00	0,00	45	32,8	68,7	47,8
Zm006285_at	0,00	0,00	20	37,9	44,1	35,8
Zm000019_at	0,00	0,00	16	117	200	242
Zm006481_s_at	0,00	0,00	14	26,9	32,1	31,5
Zm002987_at	0,00	0,00	14	83,7	80,8	119
Zm004433_at	0,00	0,00	12	53,8	35,3	127
Zm010323_s_at	0,00	0,00	11	45,4	63	71,5
Zm016864_s_at	0,01	0,01	11	89,5	55,6	1280
Zm018791_at	0,01	0,01	11	41,4	34,7	252
Zm028405_s_at	0,00	0,00	10	69	65,1	89
Zm021403_at	0,00	0,00	10	42,2	41,4	71
Zm054116_s_at	0,00	0,00	10	93,3	62,4	219
Zm002990_x_at	0,00	0,00	10	13,6	29,5	29,2
Zm005761_at	0,00	0,00	9,6	33,2	40	46,7
Zm035082_s_at	0,00	0,00	8,5	83	84	143
Zm066342_at	0,00	0,00	8,2	52,9	59,2	199
Zm032921_s_at	0,00	0,00	8,1	57,5	29,8	90,5
Zm040564_x_at	0,01	0,01	7,5	277	143	3710
Zm051284_at	0,01	0,01	6,5	53,2	40	194
Zm011554_at	0,03	0,04	5,4	72,5	64,2	895
Zmmetall_x_at	0,01	0,01	5,3	325	199	2330
Zm011554_x_at	0,04	0,04	4,9	63,5	62,6	664

Exemplo 2.2 *Desenvolvimento de um cassete de expressão*

Foi recolhida evidência de sequência de DNA para identificar cDNAs correspondentes a Zm033444_S_AT. Bases de dados públicas e priva-

das foram consultadas por BLASTN com a sequência Zm033444_S_AT. Resultados de cDNA com equivalência exacta em relação à sequência de pesquisa se inserem em dois contigs semelhantes. ZmABT1 corresponde a Maize.1482.c47 e Maize.1908.c31, e a ZmABT2 corresponde a Maize.1482.c32, Maize.1482.c28, Maize.1482.c53, Maize.1908.c17, Maize.1908.c20, Maize.1908. c37 e AI947567. As sequências Zm033444_S_AT, ZmABT1 e ZmABT2 foram usadas para consultar a base de dados de sequências de DNA genômico de milho para identificar a(s) sequência(s) reguladora(s) que dão alta expressão em tecido que não de pendão e pequena ou nenhuma expressão em pendões. As consultas identificaram três entradas, AZM4_12, ZmGSStuc11-12-04.4740.1 e MAGI_88845, que se juntam num único contig. A sequência gDNA ZmABT é mostrada na SEQ ID NO: 46. Ela codifica os dois ZmABT1 e ZmABT2 (SEQ ID NO: 33 e 34, respectivamente). São alternativamente variantes ligadas do mesmo transcrito.

ZmABT1 é codificado nos 5 éxons, e ZmABT2 é codificado nos 6 éxons. O éxon adicional fica entre o éxon 1 e o éxon 2 de ZmABT1. A maior estrutura de leitura aberta de ZmABT1 e ZmABT2 foi usada para definir os seus códons de início e stop da tradução. Os dois cDNAs usaram o mesmo códon de início e stop da tradução. Esta informação viabiliza o design de um cassete de expressão à base de ZmABT.

Exemplo 3: Construção de um cassete de expressão ZmABT-GUS

Uma estratégia de design inclusiva, de estrutura com base em genes foi usada para o construto do cassete de expressão ZmABT. Para incorporar a conhecida ligação alternativa deste gene no cassete de expressão, a estratégia de design foi baseada na estrutura de ZmABT1. A cassete contém 2,615 kb da sequência 5', que consiste em 2,020 kb de sequência 5' não transcrita, 12 pb de 5'-UTR e 0,58 kb representando o éxon 1, o íntron 1 e 16 pb de éxon 2. O códon de iniciação da tradução natural foi silenciado para ser moveido para o segundo éxon. A cassete de expressão também contém 1,039 kb da sequência 3' que começa logo depois do códon de paragem da tradução. Isto inclui 0,603 kb de 3'-UTR e 0,436 kb de sequência não transcrita, e funciona como terminador transcricional e sinal de poliadenilação.

O promotor ZmABT foi amplificado a partir do padrão de gDNA de milho graúdo em uma reação de de DNA polimerase com 50 µL Proofstart (Qiagen) contendo 10 µg de gDNA, 5 µL de tampão Proofstart 10X, 1,0 µL de dNTP mix 10 mM, 1,0 µL de ABT P1 forw (5'- CGACCAGCGCGACATGCATGGCA-3' 20 µM; SEQ ID NO: 19), 1,0 µL de ABT P2 rev (5'- ACCCCAGGGCGTACGACAAGGCC-3' 20 µM; SEQ ID NO: 20), e 10,0 µL solução Q 5X. O programa de termociclagem foi 95°C durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 67°C durante 30 segundos e 72°C durante 2,5 minutos. O passo final de extensão foi 72°C durante 10 minutos. O produto de reação de 2,6 kb foi purificado em gel de Agarose TBE 1% e o DNA foi extraído usando o Método de extração de DNA Qiaprep. O DNA foi clonado no vetor pCR-BluntII-TOPO.

O promotor ZmABT foi modificado em uma série de reações de mutagênese para silenciar o códon START endógeno, silenciar o sítio de restrição SanDI e corrigir mutações pontuais criadas durante a amplificação. Isto foi feito usando o kit para mutagênese Multi-site Stratagene QuikChange. Os 25 µL de reação continham 1 µL de promotor pCR4-TOPO-ZmABT, 2,5 µL de tampão QuikChange 10X, 1 µL de dNTP mix QuikChange, 0,75 µL de solução Quik, 1 µL de DNA polimerase QuikChange e 1 µL a 20 µM de de pelo menos um dos seguintes oligonucleotídeos:

pABT mut1 (5'-GATGGCCGGATTGGGCTCCCGGGGTGGAG-3') (SEQ ID NO: 21)

pABT mut2 (5'-CTGGGAGGCGCGCAAGGGGCAGTTCCTCG-3') (SEQ ID NO: 22)

pABT mut3 (5'-CCCACCGCCGGAGCACCGAAAGGCCCCGCG-3') (SEQ ID NO: 23)

pABT mut4 (5'-GTCACCCGGGAGCACTTCCCGGCGCCG-3') (SEQ ID NO: 24)

pABT mut5 (5'-CATTGGGCCGAGCACGGCTTCTTCCGC-3') (SEQ ID NO: 25)

pABT mut6 (5'-GGGGTACGGTGTTCTTGAGTCGTGAAGCGAC-3') (SEQ ID NO: 26)

O programa de termociclagem foi 95°C durante 1 minuto seguido por 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto e 65°C du-

rante 12 minutos. O produto foi processado como descrito pelo fabricante (Stratagene) e completamente sequenciado. A sequência promotora ZmABT é mostrada na SEQ ID NO: 35.

O promotor ZmABT corrigido foi amplificado em PCR a partir do vetor TOPO em uma reação de DNA polimerase 50 µL Proofstart (Qiagen) como acima usando iniciadores pABT amp1 (5'-GCGTCTAGAGGGACCCC-GACCAGCGCGACATGCATGGCA-3'), descrito na SEQ ID NO: 27 e pABT amp2 (5'-ACCCCAGGGCGTACGACAAGGCCCCACCATGGGCGC-3'), descrito na SEQ ID NO: 28. O produto de PCR foi purificado em gel de Agarose TBE 1% e o DNA foi extraído usando o método de extração de DNA Qiaprep. O DNA foi clonado no vetor pCR-BluntII -TOPO, transformado e sequenciado. O promotor ZmABT foi excisado como um fragmento XbaI/NcoI e ligado a pNOV6901.

O terminal ZmABT foi amplificado a partir do padrão de gDNA de milho em uma reação de DNA polimerase 50 µL Extensor (ABgene) contendo 10 µg de gDNA, 5 µL de 10X tampão Extensor No. 1, 2,0 µL de mistura de dNTP a 10 mM, 2,0 µL de ABT P4 a 20 µM (5'-TATATAGAGCTCG-AATCGAAGAAGCCACACTGTAAATCTGCCGGG-3'; SEQ ID NO: 29), 2,0 µL de ABT P5 a 20 µM (5'-AGCAAGGCATATGCAGCAGCTGCTGGTCG-GACCGGGCCCTATATA-3'; SEQ ID NO: 30), 10 µL de solução Q 5X, 0,5 µL de DNA polimerase Extensor e 0,5 µL de DNA polimerase Amplitaq. As reações foram cobertas com óleo mineral e o programa de termociclagem foi 95°C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 98°C durante 2 segundos, 63°C durante 1 minuto e 68°C durante 4 minutos. A etapa final de extensão foi 68°C durante 7 minutos. O produto de reação 1 kb foi purificado em gel de agarose TAE a 1%, e o DNA foi extraído usando Método de extração de DNA Qiaprep. O DNA foi precipitado em etanol e recuperado em 4 µL de ddH_2O, depois clonado no vetor pCR4-TOPO-Blunt.

O terminal ZmABT foi modificado para remover os sítios de restrição internos NcoI e XhoI usando o kit para mutagênese Multissítio Stratagene QuikChange, como acima. A reação de 25 µL continha 1 µL pCR4-TOPO-ZmABT-promotor, 2,5 µL 10X tampão QuikChange, 1 µL de mistura de

dNTP QuikChange, 0,75 µL de solução Quik, 1 µL de DNA polimerase Quik-Change e 1 µL de de pelo menos um dos seguintes oligonucleotídeos 20 µM:
ABTt m1 (5'- GTCATGCATGGGCATGTGAAGGAGGAGCC-3') (SEQ ID NO: 31)
ABTt m2 (5'- GTTGCATGCATGCTGCATGGCGTCGAGAT-3') (SEQ ID NO: 32)

O programa de termociclagem foi 95°C durante 1 minuto seguido por 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto e 65°C durante 13 minutos. O produto foi processado como descrito pelo fabricante (Stratagene) e completamente sequenciado. A sequência terminadora ZmABT é mostrada na SEQ ID NO: 36.

O terminal ZmABT foi excisado como um fragmento SacI/ApaI e ligado ao vetor pNOV6901-prABT (acima). Este plasmídeo 15772 produzido (Montagem ZmABT), e um mapa de plasmídeo são mostrados na SEQ ID NO: 44. O cassete de expressão completa ZmABT foi mobilizado como um fragmento SanDI/RsrII no sítio RsrII do Vetor binário de *Agrobacterium* 15289. Um mapa de plasmídeo deste construto, 15773, é mostrado na SEQ ID NO: 45.

Exemplo 4: Extensão de Sequências de Sonda de DNA para Cassetes de Expressão Designados

Sequências de DNA representando sondas no chip de milho graúdo podem ser facilmente estendidas para cassetes de expressão designidas seguindo as etapas descritas acima. A sequência de DNA para sondas identificadas como representando genes que são altamente expressos em todas as amostras de tecido e não expressos no pólen (Tabela A) e os que são altamente expressos em todas as amostras de tecido e têm reduzida expressão em amostras do pendão (Tabela E) é descrita como SEQ ID NOs: 47-79.

Uma sonda candidata adicional proveniente da análise de perfil de expressão para cada categoria de expressão foi selecionada para demonstrar progressão a partir desta sequência de DNA para um vetor binário terminado com o cassete de expressão designada ligado ao gene repórter GUS. O método usado é idêntico ao para ZmABP3 e ZmABT. Em suma as etapas do processo a ser aplicado são como segue:

1. Flanquear cada cassete de expressão com sítios SanDI/RsrII e reportar como clonada no sítio RsrII de 15289 (SEQ ID NO: 80).

2. O Promotor consiste em 1000-1500 pb de sequência a montante do sítio de iniciação da transcrição e estende 10 bases no segundo éxon, ou no códon de iniciação da tradução natural se ele não está silenciado no primeiro éxon. Termina com a sequência 'gtaaaccatgg' de milho graúdo otimizado Kozak. O códon de início da tradução modificado é agora incorporado no sítio NcoI de restrição de endonuclease 'ccatgg'. Mutar todos os códons de iniciação da tradução nos transcritos teóricos que estão a montante do sítio NcoI modificado. Assegurar que pelo menos um codon de paragem está em cada estrutura de leitura a montante do sítio NcoI modificado. O promotor é concebido para ser flanqueado por XhoI/SanDI na extremidade 5' e NcoI na extremidade 3'.

3. O Gene de interesse (GDI) é representado pelo gene repórter GUS como um fragmento NcoI/SacI.

4. O terminal se estende desde pouco depois do códon de paragem da tradução para 1 kb a jusante. O terminal é concebido para ser flanqueado por SacI na extremidade 5' e RsrII/XmaI na extremidade 3'.

5. O cassete de expressão completa é concebido para ser mobilizado como um fragmento SanDI/RsrII, que pode ser ligada no sítio RsrII localizado no Vetor binário de *Agrobacterium* tal como 15289 (SEQ ID NO: 80).

6. Mutar todos os sítios internos SanDI, RsrII, NcoI, SacI, XhoI e XmaI por substituição de base única para os silenciar.

Através da aplicação destas etapas básicas pode ser concebida um cassete de expressão da planta (SEQ ID NO: 81) que corresponde à sonda Zm058948_s_at (SEQ ID NO: 55) e um cassete de expressão de planta (SEQ ID NO: 82) que corresponde à sonda Zm002990_s_at (SEQ ID NO: 62). A primeira é um cassete de expressão que deve ser transcrito em todos os tecidos de milho graúdo e não no pólen. O último é um cassete de expressão que deve ser transcrito em todos os tecidos de milho graúdo e tem reduzida transcrição nos pendões. Esta estratégia de design aplica todas as sondas identificadas nas Tabelas A e E.

Detalhes adicionais de como fazer esses cassetes de expressão estão descritos na US2005235311, que é aqui incorporada como referência na sua integridade.

BIBLIOGRAFIA

Ammirato et al., eds., (1984) *Handbook of Plant Cell Culture--Crop Species*, Macmillan Publ. Co., New York, N.Y.

An et al., (1985) EMBO J. 4, 277 287

Auch & Reth et al.

Batzer, et al., *Nucleic Acid Res*. 19:5081 (1991)

Byrne, M. C., McDonnell, R. E., Wright, M. S. e Carnes, M. G., 1987. "Strain and Cultivar Specificity in the Agrobacterium-soybean Interaction." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 8:3-15

Christou et al., *Plant Physiol*. 87:671-674 (1988)

Christou et al., *Biotechnology* 9: 957-962 (1991)

Crossway et al., *BioTechniques* 4:320-334 (1986)

Datta et al., *Bio/Technology* 8:736-740 (1990)

Fromm et al., *Bio/Technology* 8:833-839 (1990)

Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L.M., Allen, G.J. Alper, S.L., Fink, G.R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from over-expression of the AVP1 H^+-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 98: 11444-11449.

Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2:603-618 (1990)

Gruber, et al., "*Vectors for Plant Transformation, in Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology*" in Glich, et al., (Eds. pp. 89-119, CRC Press, 1993).

Guthrie, W. D., F. F. Dicke, e C. R. Neiswander (1960) Leaf e sheath feeding resistance to the Eur. corn borer in eight inbred lines of dent corn. *Ohio Agric. Exp. Stn. Res. Bull*. 860.

Guthrie, W. D. (1989) Advances in Rearing the European Corn Borer on a Meridic Diet, *In: Toward Insect Resistant Maize for the Third World; Proceedings of the International Symposium on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects.* Mexico, D. F.:CIMMYT

Hiei et al., (1994) *Plant J.* 6, 271-282

Hinchee et al., *Biotechnology* 6:915-921 (1988)

Hoekema (1985) The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasserdam, Chap. V

Klein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4305-4309 (1988)

Klein et al., *Bio/Technology* 6:559-563 (1988)(maize); Klein et al., *Plant Physiol.* 91:440-444 (1988)

Knauf, et al., 1983

Koziel et al., *Biotechnology* 11: 194-200 (1993)

Lindsey K, Wei W, Clarke MC, McArdle HF, Rooke LM, Topping JF. Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Res.* 1993 Jan;2(1):33–47.

Lopez, I, Anthony, R.G., Maciver, S.K., Jiang, C.-J., Khan, S., Weeds, A.G., Hussey, P.J. (1996) Pollen specific expression of maize genes encoding actin depolymerizing factor-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 93: 7415-7420.

Lörz et al. (Mol. Gen. Genet. 199, 178, (1985))

McBride, et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 91:7301-7305

McCabe et al., *Biotechnology* 6:923-926 (1988)

Ohtsuka, et al., J*. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985)

Pacciotti et al. (1985) *Bio/Technology* 3:241

Park et al., 1985

Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurrago, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R.A. (2005). Up-regulation of a H^+-pyrophosphatase (H^+-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 102: 18830-18835.

Paszkowski et al., *EMBO J.* 3:2717-2722 (1984)

Pearson, W.R. (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98

Potrykus, I., Paszkowski, J.P., Saul, M.W., Petruska, P. e Shillito, R.D. 1985. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. *Mol. Gen. Genet*. 199:169–177.

Ritchie, S.W., Hanway, J.J., Benson, G.O. (1997). How a corn plant develops: Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension service: Ames, Iowa.

Riggs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 83:5602-5606 (1986)

Rossolini, et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)

Sambrook et al. supra; Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Maniatis et al. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982); Advanced Bacterial Genetics, Davis et al. (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1980)

Sanford et al., *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (1987)

Shimamoto et al., Nature 338: 274-277 (1989)

Shirzadegan, M., Christie, P., Seemann, J. (1991) An efficient method for isolation of RNA from tissue-cultured plant cells. *Nucleic Acids Res.* 19(21): 6055.

Smith e Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489

Sukhapinda et al., Plant Mol. Biol., vol. 8:209-216, 1987

Svab et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87: 8526-8530 (1990)

Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, New York.

Vasil et al., *Biotechnology* 11: 1553-1558 (1993)

Weeks et al., *Plant Physiol.* 102: 1077-1084 (1993)

Weissinger et al., *Annual Rev. Genet.* 22:421-477 (1988)

Literatura de Patentes:

EP 0 332 581

EP 0 292 435

EP 0 295959

EP 0 138341

EP 0 120516

Patente U.S. No. 5.451.513

Patente U.S. No. 5.545.817

Patente U.S. No. 5.545.818

U. S. Pat. No. 5.350.689

Patente U.S. No. 5.451.513

Patente U.S.. No. 4.945.050

WO 95/16783

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende um promotor de milho modificado consistindo na SEQ ID NO: 13; em que a SEQ ID NO: 13 foi modificada para silenciar um códon de início de tradução natural.

2. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende um terminador da transcrição modificado consistindo na SEQ ID NO: 14; em que a SEQ ID NO: 14 foi modificada para remover um sítio interno de restrição.

3. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende um promotor de milho modificado como definido na SEQ ID NO: 13.

4. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um terminador de transcrição modificado como definido na SEQ ID NO: 14.

5. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência de nucleotídeos heteróloga ou um fragmento desta, em que o promotor de milho modificado está operacionalmente ligado à sequência de nucleotídeos heteróloga ou o promotor de milho modificado está operacionalmente ligado à sequência de nucleotídeos heteróloga que está operacionalmente ligada ao terminador de transcrição modificado, em sequência.

6. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga é SEQ ID NO: 47.

7. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende um promotor de milho modificado de acordo com a SEQ ID NO: 13, e, opcionalmente, um terminador de transcrição modificado de acordo com a SEQ ID NO: 14.

8. Vetor de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência de nucleotídeos heteróloga ou um fragmento desta operacionalmente ligado ao promotor de milho modificado.

9. Vetor de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sequência heteróloga é SEQ ID NO: 47.

10. Método para produção de uma planta transgênica de milho

expressando uma sequência de DNA de interesse em tecido outro que polén, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) transformar um cassete de expressão, como definido em qualquer uma das reivindicações 2 a 5, ou uma molécula de vetor, como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 8, em uma célula de planta de milho ou tecido de planta de milho; e

(b) regenerar a célula de planta de milho transformada na etapa a) em uma planta de milho; em que o produto de expressão da sequência de DNA de interesse fica abaixo de um nível biologicamente eficaz no pólen da planta de milho regenerada, em que a concentração do produto de expressão no pólen está abaixo de pelo menos um de 10ng/mg, 5ng/mg, 3ng/mg ou 2ng/mg.

11. Método para controle de insetos peste alvo alimentando-se de tecido vegetativos de uma planta de milho tal como folha, caule e raiz e/ou dos tecidos reprodutivos da planta de milho, tal como espiga, enquanto se protege pestes não alvo alimentando-se do pólen da planta de milho, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) cultivar uma planta de milho produzida pelo método, como definido na reivindicação 10, em uma área que é infestada com a peste alvo; e

(b) expressar na planta de milho um polipeptídeo ou proteína que é capaz de controlar a referida praga alvo sob controle de um promotor de planta modificado, como definido na SEQ ID NO: 13.

12. Método para proteção de tecidos reprodutivos da planta de milho, particularmente pólen e/ou pendão contra dano causado por expressão nos referidos tecidos de um polipeptídeo ou proteína de interesse, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) cultivar a referida planta de milho produzida pelo método, como definido na reivindicação 10; e

(b) expressar na referida planta de milho um polipeptídeo ou proteína de interesse sob o controle de um promotor de planta, como definido na SEQ ID NO: 13.

13. Sequência promotora de planta de milho, como definida na reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que medeia a transcrição de um polinucleotídeo codificador de proteína de interesse operacionalmente associado de forma que tal polinucleotídeo associado é transcrito na maioria dos tecidos de uma planta de milho, em que um produto de expressão do polinucleotídeo codificando proteína operavelmente associada de interesse fica abaixo de um nível biologicamente eficaz no pólen da planta de milho, em que a concentração do produto de expressão no pólen está abaixo de pelo menos um de 10ng/mg, 5ng/mg, 3ng/mg ou 2ng/mg.