



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

(21) PI 0812177-0 A2



* B R P I 0 8 1 2 1 7 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 30/05/2008

(43) Data da Publicação: 23/09/2014
(RPI 2281)

(51) Int.Cl.:

A01G 7/00

A01H 5/10

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SAFRA,
MISTURA DE SEMENTES PRÉ-EMBALADAS,
MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE SAFRA E MÉTODO
PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE
LICENCIAMENTO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2007 US 60/941,466

(73) Titular(es): Syngenta Participations AG

(72) Inventor(es): Aron Louis Silverstone, Kenneth A. Dallmier,
Rene Quadt

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008065203 de
30/05/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/150948de
11/12/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SAFRA, MISTURA DE SEMENTES PRÉ-EMBALADAS, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE SAFRA E MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE LICENCIAMENTO"**.

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à biologia molecular de uma planta, particularmente a métodos e composições para otimizar misturas de plantas a fim de obter materiais de plantas colhidas comercialmente desejáveis.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Com o surgimento das tecnologias transgênicas, foram inventadas novas formas de melhorar o desempenho agrônomo de plantas para alimentação humana e animal e aplicações de processamento. Além disso, a capacidade de expressar genes estrangeiros usando tecnologias transgênicas abriu opções para a produção de grandes quantidades de produtos co-

15 mercialmente importantes em plantas. Novos genes-alvos de origem vegetal e microbiana estão rapidamente se tornando disponíveis para melhorar a característica agrônoma de espécies cultivadas, bem como as propriedades das plantas. Esses avanços resultaram no desenvolvimento de plantas com características desejáveis, como resistência a doenças, insetos e herbi-

20 cidas, tolerância ao calor e à seca, a redução do tempo para a maturidade de colheita, melhor processamento industrial, como a conversão de amido ou de biomassa em açúcares fermentáveis, e melhorou a qualidade agromônica, como o alto teor de óleo e alto teor de proteína.

Existe a necessidade da técnica desenvolver estratégias para o

25 uso de material de planta colhida que exiba uma variedade de características que exigem níveis de expressão-alvo diferentes para otimizar a eficiência e a produtividade das plantas utilizadas em processos comerciais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Aqui são fornecidos métodos e composições para a produção de

30 uma cultura com um nível predeterminado ("nível-alvo") de pelo menos uma característica primária de interesse. As características primárias de interesse incluem quaisquer características que melhoram ou facilitam a conversão de

material vegetal colhido em um produto comercialmente útil. O nível predominado da característica primária é obtido pela mistura de material vegetal colhido pelo menos duas variedades de plantas, onde pelo menos uma das variedades apresenta a característica primária de interesse. A mistura pode ser personalizada para uso em uma variedade de usos industriais ou agrícolas comercialmente importantes. Em várias modalidades, uma mistura de sementes é fornecida onde as sementes de uma primeira variedade de plantas que exibem pelo menos uma característica primária de interesse é misturada com sementes de pelo menos uma segunda variedade de plantas que podem apresentar pelo menos uma segunda característica primária de interesse para atingir o nível desejado da característica ou características da colheita ou do material vegetal colhido a partir das plantas cultivadas a partir da mistura de sementes. O nível-alvo pode ser alcançado por material de plantas cultivadas a partir de uma mistura de sementes pré-misturada ou individualmente por plantação de sementes de cada variedade, na proporção-alvo e, posteriormente, mistura de plantas colhidas de cada variedade. A mistura pode apresentar uma única característica primária de interesse, ou pode coletivamente apresentar múltiplas características primárias de interesse. Onde múltiplas características primárias estão presentes, diversas variedades diferentes de plantas podem ser utilizadas, onde cada variedade apresenta uma característica primária de interesse diferente, ou onde uma ou mais variedades apresentam características múltiplas de interesse. Uma ou mais variedades na mistura pode ainda exibir umas características secundárias de interesse. As características secundárias de interesse incluem características que são essencialmente benéficas para uma empresa de sementes, um agricultor, ou um processador de grãos, por exemplo, resistência a herbicidas, resistência do vírus, resistência a patógenos bacterianos, resistência a insetos e resistência a fungos.

As sementes e/ou os grãos que exibem uma característica primária de interesse podem ser distinguidas de sementes ou grãos que não contêm a característica primária de interesse, e/ou distinguidas a partir de sementes ou grãos contendo uma característica primária de interesse dife-

rente, com base na cor do revestimento de sementes. A cor do revestimento diferenciado de sementes pode ser o resultado da variabilidade genética de ocorrência natural, introduzida por transgenes que se codificam para uma diferença de cor da semente, ou através da aplicação externa de um corante ou corante para as sementes ou grãos contendo as diferentes características primárias de interesse.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 apresenta um fluxograma que descreve o processo geral utilizado no desenvolvimento de uma mistura de sementes que produzem uma colheita que contém um nível-alvo de uma característica de interesse. A figura 2 demonstra a sinergia entre CA (referido como STEEP) e TIGA. As incubações foram realizadas por 2h a 70°C.

A figura 3 mostra os resultados do experimento da balança de massa. Uma mistura de 80% TIGA e 20% CA foi incubada a 65°C ou 70°C por 3 dias. As amostras foram recolhidas a cada dia e os açúcares solúveis e o amido residual foram medidos em cada amostra.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os métodos da invenção encontram uso particular na integração das práticas atuais para o cultivo de plantas cultivadas em uma fórmula definida para a obtenção de material de plantas colhidas comercialmente desejáveis que é otimizado para um uso final específico. Por exemplo, o material vegetal colhido pode ser usado como uma fonte de biomassa para a produção de açúcares fermentados ou para consumo humano e/ou agrícola.

Plantas com uma ou mais características primárias de interesse são plantadas em um campo em uma proporção para fornecer um percentual predeterminado de plantas contendo a(s) característica (s) de interesse na colheita total plantada no campo. A colheita da safra total, ou uma parte representativa do total da safra, resulta em uma mistura de material vegetal em que a(s) característica(s) principal(is) de interesse está/estão presente(s) em um nível ótimo (ou seja, "o nível-alvo") para um uso final particular. Os usos finais incluem produtos úteis agronomicamente e industrialmente, incluindo fermentação de matérias-primas, biocombustíveis, alimentação animal e

alimentação humana. A "relação-alvo" refere-se à porcentagem de material da planta de cada variedade de planta na mistura que é ideal para fornecer o nível predeterminado da característica ou características de interesse para o uso final pretendido. Conforme utilizado aqui, uma "variedade de planta" refere-se a uma subdivisão de espécies de plantas que foram criadas ou intencionalmente selecionadas e mantidas, e que diferem do restante das espécies em certas características. Nas práticas da invenção, a diferença de variedades de plantas cultivadas a partir da mistura de sementes só pode ser a característica primária ou características exibidas por cada variedade de planta. No entanto, não é necessário que cada variedade de planta na mistura seja da mesma espécie. Em algumas modalidades, cada variedade de planta na mistura é reprodutivamente compatível com pelo menos outra variedade na mistura.

A relação-alvo da colheita que exhibe a(s) característica(s) primária(s) de interesse para a colheita não apresentando a(s) característica(s) primária(s) de interesse pode ser determinada através da realização de uma série de testes em laboratório e campo para determinar o nível ótimo da(s) característica(s) primária(s) que são necessárias para o uso final pretendido. Para efeitos da presente invenção, uma colheita que "apresenta" uma característica de interesse é aquela que tem um nível mensurável daquela característica. Por exemplo, uma colheita que apresenta maior teor de proteína tem um nível mensurável de proteína que é maior que a de uma colheita que não apresenta teor de proteína aumentado. A medição pode ser realizada de forma visual, mecânica, biológica ou química. As características que resultam da expressão de uma sequência de ácido nucleico heterólogo (isto é, plantas "transgênicas" ou "geneticamente modificadas") ou características que resultam da expressão de um ácido nucleico endógeno (isto é, que ocorrem naturalmente, ou são introduzidas através da reprodução) podem ser medidas pela avaliação do nível de expressão de tal sequência de ácido nucleico, ou medidas pelo nível ou atividade de um ou mais genes de plantas endógenas, proteínas e/ou metabolitos modulados por essa sequência de ácido nucleico.

A relação-alvo da colheita pode ser obtida através do plantio de sementes fornecidas em uma mistura de sementes pré-misturadas, pela mistura de sementes, na relação-alvo no momento do plantio, por plantar sementes separadamente para cada variedade de planta na relação-alvo, ou por mistura de material de planta colhida na relação-alvo ou após o momento da colheita. Uma "mistura de sementes" refere-se a uma mistura de sementes de duas ou mais variedades de plantas. Quando fornecido em uma composição pré-misturada, as sementes são misturadas a um nível predeterminado para obter a relação-alvo de colheita das plantas cultivadas a partir das sementes. Através de uma "planta de colheita" se destina a qualquer planta que é cultivada com a finalidade de produzir material da planta que é plantada pelo homem (uma "colheita"), quer para consumo por seres humanos ou animais agrícolas, para produção de biomassa para utilização em uma indústria, processo farmacêutico ou comercial. A invenção pode ser aplicada a qualquer uma das variedades de plantas, mas são particularmente úteis para as plantas como descritas aqui.

Conforme utilizado aqui, o termo "parte da planta" ou "material da planta colhido" ou "colheita" inclui, células da planta, protoplastos de plantas, tecidos de células de plantas a partir do qual as plantas podem ser regeneradas, calos de plantas, touceiras de plantas e células vegetais que estão intactas em plantas ou partes de plantas, como os embriões, pólen, óvulos, sementes, folhas, flores, ramos, frutos, grãos, orelhas, espigas, cascas, caules, raízes, pontas de raízes, anteras, tubérculos, rizomas e similares. O termo "semente" refere-se à estrutura de maturidade reprodutiva produzida com a finalidade de propagar a espécie e é comumente vendida a produtores. O termo "grão" inclui sementes produzidas pelos agricultores para uso na fazenda ou de distribuição comercial, em ambos os casos para fins diferentes do crescimento ou de reprodução da espécie. O tipo de material de planta colhido útil na presente invenção depende do uso final.

Como usado aqui, "biomassa" refere-se ao material biológico coletado e destinado para posterior processamento para isolar ou concentrar o produto derivado de interesse. "Biomassa" pode incluir o fruto ou partes

dele ou de sementes, folhas, caules e raízes, ou onde estas são as partes da planta que são de interesse especial para fins industriais. "Biomassa", como refere-se ao material da planta colhida, inclui uma estrutura ou estruturas de uma planta que contêm ou representam o produto de interesse.

- 5 O artigo "um" é aqui utilizado para se referir a um ou mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. Por exemplo, "um elemento" significa um ou mais elementos. Por todo o relatório a palavra "compreendendo" ou suas variações como "compreende" ou "que compreende", será entendida como a inclusão de um elemento indicado, número
- 10 inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas.

Composições

- A. Sementes A relação-alvo(ou nível predeterminado) de uma característica
- 15 ou características de interesse pode ser obtida através do plantio de sementes fornecidas em uma mistura de sementes pré-misturadas, pela mistura de sementes, na relação-alvo no momento do plantio, por plantar sementes separadamente para cada variedade de planta na relação-alvo, ou por mistura de material de planta colhida na relação-alvo ou após o momento da colheita.
- 20 A "relação-alvo" refere-se à proporção de sementes ou a proporção de material de planta colhida de cada variedade em uma mistura necessária para atingir o nível-alvo da característica ou características de interesse. O "nível-alvo" inclui o nível de característica de interesse em uma mistura de material planta colhido (por exemplo, o nível de expressão da enzima, o nível
- 25 de teor de proteína, o nível de teor de óleo, nível de teor de vitaminas, etc) que é adequado, de preferência ideal, para um uso final particular. Uma "misturado material da planta colhida" refere-se a uma mistura de material obtido através de uma pluralidade de plantas onde uma percentagem destas plantas têm uma ou mais característica(s) primária(s) de interesse.

- 30 Em uma modalidade, a mistura consiste de material da planta colhido a partir de uma primeira variedade de plantas exibindo um ou mais característica(s) primária(s) de interesse e de uma segunda variedade de

plantas que não apresentam a(s) característica(s) primária(s) de interesse. Em uma modalidade, a mistura consiste de material da planta colhido a partir de uma primeira variedade de plantas que apresenta uma ou mais característica(s) primária(s) de interesse e de uma segunda variedade de plantas que não apresentam a(s) característica(s) primária(s) de interesse. Em outra modalidade, a mistura compreende material de planta colhido a partir da primeira e a segunda variedades de plantas, como descrito acima, além de uma ou mais variedades adicionais que não apresentam a(s) característica(s) primária(s) de interesse, apresentam uma ou mais diferentes características primárias de interesse, ou que têm uma ou mais da(s) mesma(s) característica(s) primária(s) de interesse como a primeira ou a segunda variedade ou ambos, ou algum tipo de combinação. É contemplada a possibilidade de qualquer combinação de plantas que contenham qualquer número de características primárias de interesse seja útil na presente invenção, desde que a mistura final contenha a(s) característica(s) primária(s) de interesse em um nível que seja adequado, de preferência melhor, para o uso final. Qualquer uma ou mais das variedades pode ainda apresentar uma ou mais características secundárias de interesse como discutido aqui. Portanto, em uma modalidade, a invenção apresenta um artigo de fabricação, incluindo material de embalagem e sementes de plantas dentro do material de embalagem. As sementes da planta podem compreender cerca de 0,1% a cerca de 99,9%, incluindo cerca de 1%, cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 98% e cerca de 99%, sementes de uma primeira variedade e cerca de 0,1 a cerca de 99,1%, incluindo cerca de 1%, cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 98% e cerca de 99%, sementes de uma segunda variedade,

onde a soma da porcentagem de cada variedade de planta é igual a 100% da mistura total de sementes. As plantas oriundas de sementes da primeira variedade apresentam uma ou mais característica(s) primária(s) de interesse. As plantas oriundas de sementes da segunda variedade podem ou não

5 apresentar a mesma característica primária de interesse. Em algumas modalidades, a segunda variedade apresenta uma ou mais características primárias diferentes de interesse. Em outras modalidades, a segunda variedade não apresenta uma característica primária de interesse. A invenção pode ainda compreender cerca de 0,1% a cerca de 99,8%, incluindo cerca de 1%,

10 cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97%, cerca de 98% e cerca de 99%, sementes de uma ou mais variedades adicionais

15 nais que podem ou não podem conter uma característica primária de interesse. As sementes são misturadas na relação-alvo, plantadas em um campo e materiais de plantas colhidas das plantas que tem o nível-alvo da(s) característica(s) primária(s) de interesse. Em uma modalidade, o artigo de manufatura composto por uma mistura substancialmente uniforme de se-

20 mentes de cada uma das variedades é climatizado e ensacado em embalagens conhecidas por meio da técnica. A semente é misturada em uma relação-alvo na instalação de processamento de semente. Tal saco de sementes, de preferência, possui uma etiqueta do pacote que acompanha o saco, por exemplo, uma marca ou etiqueta presa ao material de embalagem, um

25 rótulo impresso na embalagem ou rótulo inserido dentro do saco. O rótulo da embalagem indica que suas sementes são uma mistura de variedades, por exemplo, duas ou mais variedades diferentes. O rótulo da embalagem pode indicar que as plantas oriundas de sementes possuem uma ou mais características primárias e/ou secundárias de interesse. O rótulo da embalagem

30 também pode indicar que a mistura de sementes contidas permite a detecção de sementes que contenham a característica de interesse antes de plantio e/ou quando colhidas.

Em outra modalidade, o artigo de fabricação, incluindo material de embalagem e sementes de plantas dentro do material de embalagem, consiste de uma única variedade de sementes de plantas. As sementes de cada variedade necessárias para produzir a mistura final de plantas colhidas são empacotadas separadamente e fornecidas ao produtor. Um "agricultor" é a pessoa responsável pelo plantio, manutenção e colheita em uma safra. Além disso, são fornecidas instruções para o agricultor que definem a relação-alvo de sementes a serem plantadas no campo. As sementes são misturadas na relação-alvo pelo produtor, antes do plantio, por qualquer meio mecânico adequado, e a semente plantada é misturada no campo. Alternativamente, as sementes podem ser plantadas no campo, utilizando equipamentos de plantio capazes de separar as sementes de cada variedade (por exemplo, um plantador de 12 filas, um plantador de 16 filas, um plantador de pula linha, etc). A relação-alvo é atingida pelo plantio das sementes de cada variedade em diferentes fileiras onde o número de fileiras de cada variedade depende do número de plantas de cada variedade que são necessárias para atingir o nível-alvo da característica primária de interesse no material da planta colhida. Neste exemplo, o material da planta colhido pode ser combinado conforme é colhido e levado para o setor de processamento e secagem como uma mistura contendo o nível-alvo da(s) característica(s) primária(s) de interesse.

Alternativamente, o material de planta ou colheita de cada variedade pode ser colhido independentemente. O material da planta colhido pode ser combinado na relação-alvo na instalação de descarga ou nas instalações de secagem ou processamento. Nesta modalidade, não é necessário plantar sementes de cada variedade em qualquer relação particular, desde que o material da planta de cada variedade seja colhido separadamente e que o material da planta colhido seja misturado na relação-alvo pré-determinada. Também não é necessária a colheita de material da planta de cada uma das variedades, ao mesmo tempo durante a estação de crescimento, a menos que o material da planta colhido seja misturado no momento da colheita (ou seja, no campo).

A composição da semente pode ser formulada em uma quantidade de cerca de 0,1 quilos (kg) ou mais, cerca de 0,5 kg ou mais, cerca de 1 kg ou mais, cerca de 5 kg ou mais, cerca de 10 kg ou mais, cerca de 20 kg ou mais, cerca de 35 kg ou mais, cerca de 100 kg ou mais, cerca de 1.000 kg ou mais, cerca de 10.000 kg ou mais, ou cerca de 50.000 kg ou mais. As sementes podem ser fornecidas ao produtor, em uma unidade de entrega comum, por exemplo, um saco de sementes, um saco de sementes a granel, um contêiner de sementes a granel (por exemplo, um recipiente Q-bit), um trailer de entrega a granel de sementes, e assim por diante. Onde as sementes são pré-misturadas na instalação de processamento de semente, as sementes para cada variedade estão contidas na mesma unidade de entrega comum. Quando as sementes são misturadas no momento do plantio, cada variedade é fornecida em uma ou mais unidades de entrega comum individual.

O material de sementes é normalmente tratado com um revestimento protetor incluindo herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, moluscicidas, ou suas misturas. Os revestimentos protetores normalmente utilizados incluem compostos como o captan, carboxina, tiram (TMTD ®), metalaxil (avental ®), e pirimifos-metila (ACTELLIC ®). Se desejar, esses compostos são formulados em conjunto com outros transportadores, surfactantes ou adjuvantes de promoção de aplicação habitualmente utilizados na técnica da formulação para proporcionar a proteção contra danos causados por parasitas, bactérias, fungos ou animais. O revestimento protetor pode ser aplicado por impregnação de materiais de propagação com uma formulação líquida, ou por revestimento com uma formulação molhada ou seca combinada. Outros métodos de aplicação também são possíveis, tais como o tratamento direcionado aos embriões ou frutos.

Em cada uma dessas modalidades, a primeira variedade de uma composição da semente apresenta uma ou mais característica(s) primária(s) de interesse. As outras variedades de sementes na mistura podem apresentar a(s) mesma(s) característica(s) como a primeira variedade, pode apresentar uma ou mais características primárias de interesse diferentes ou não

apresentar nenhuma característica primária de interesse. As características primárias de interesse incluem quaisquer características que melhorem ou facilitem a conversão de material vegetal colhido em um produto comercialmente útil, incluindo, por exemplo, o aumento ou alteração do teor de carboidratos e/ou distribuição, propriedades de fermentação melhorada, maior teor de óleo, maior teor de proteína, melhor digestibilidade e maior teor nutracêutico, por exemplo, aumento do teor de fitoesteróis, maior teor de tocoferol, maior teor de estanol ou maior teor de vitamina. As características primárias de interesse também incluem, por exemplo, um teor reduzido de um componente não desejado em um produto colhido, por exemplo, o ácido fítico, inibidores de tripsina de soja ou enzimas de degradação de amido, dependendo do uso final. As variedades que possuem um gene(s) para uma característica em especial possuem um aumento ou redução estatisticamente significativa na característica em relação a uma variedade que não possui ou não expressa tais genes.

Uma ou mais variedades podem exibir uma ou mais características secundárias de interesse. As características secundárias de interesse incluem características que são essencialmente benéficas para uma empresa de sementes, um agricultor, ou um processador de grãos, por exemplo, resistência a herbicidas, resistência do vírus, resistência a patógenos bacterianos, resistência a insetos e resistência a fungos. Ver, por exemplo, Patente U.S. Nos 5.569.823; 5.304.730; 5.495.071; 6.329.504; e 6.337.431. Uma característica secundária de interesse também pode ser aquela que aumenta o vigor ou produção da planta (incluindo as características que permitem uma planta crescer em diferentes temperaturas, condições de solo e níveis de luz solar e precipitação), ou uma que permita a identificação de uma planta que exibe uma característica de interesse (por exemplo, o gene marcador de seleção, cor do revestimento da semente, etc). As variedades que possuem gene(s) para uma característica secundária de interesse possuem um aumento ou redução estatisticamente significativa na característica em relação a uma variedade que não possui ou não expressa tais genes. As características primárias e/ou secundárias de interesse podem ser decorrentes de

um ou mais genes variantes de ocorrência natural, um ou mais genes trans, ou uma combinação de ocorrência natural do gene(s) ou transgene(s) variante(s).

B. Uso

5 A invenção também apresenta um método para produzir uma safra ou material de plantas colhidas com um nível predeterminado de uma ou mais características primárias de interesse. O método compreende a safra de uma colheita de um grupo de espécies vegetais que compreende cerca de 0,1% a cerca de 99,9% das sementes de uma primeira variedade e
10 cerca de 0,1 a cerca de 99,9% de sementes de uma ou mais variedades adicionais. As plantas de pelo menos uma variedade mostram uma característica primária. O material vegetal colhido de cada variedade está presente na safra final com a relação que resulta na característica primária de interesse estando presente em um nível-alvo (isto é, a "relação-alvo"), onde o nível-
15 alvo é otimizado para o uso final da safra ou do material vegetal colhido. Os usos finais incluem usos agrônômicos e industriais, por exemplo, a alimentação humana ou animal, biocombustível, álcool industrial, matérias-primas para fermentação, etc.

 Os carboidratos solúveis obtidos por mistura do material vegetal
20 colhido da presente invenção incluem carboidratos fermentáveis, que podem então ser utilizados como matérias-primas para a fermentação de etanol, bebidas contendo etanol (tais como bebidas feitas com malte e destilados), e outros produtos de fermentação, tais como alimentos, nutracêuticos, enzimas e materiais industriais. Os métodos de fermentação, utilizando matérias-
25 primas de carboidratos derivadas de plantas são bem conhecidos por aqueles versados na técnica com processos estabelecidos para vários produtos da fermentação (ver, por exemplo Vogel et al. 1996, Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design, and Equipment, Noyes Publications, Park ressalto, N.J., USA e referências citadas aqui). Em uma modalidade, os carboidratos solúveis podem ser extraídos pelo
30 esmagamento da planta, ou por difusão a partir de tecidos vegetais na água ou outro solvente adequado. O suco ou extrato resultante contendo os car-

boidratos solúveis pode ser usado diretamente como substrato para fermentação ou bioconversão de um lote, processo celular contínuo ou imobilizado. Em alternativa, parte dos carboidratos solúveis pode ser recuperada para outros usos e os componentes descobertos utilizados como matérias-primas para fermentação, como no caso do melaço remanescente após a recuperação da maior parte da sacarose por cristalização. O material vegetal colhido da invenção pode ser usado para formular alimentos ou bebidas para consumo humano ou animal, pode ser utilizado para formular dietas com amido de fácil digestão e, portanto, mais energia extraída, ou pode ser usado para melhorar a qualidade nutricional dos alimentos ou alimentação (por exemplo, aumento do teor de vitamina, maior teor de óleo, maior teor de proteínas, etc). A alimentação humana ou animal ou bebida pode ser farinha de trigo, massa de pão, pão, massas, biscoitos, bolo, espessantes, cerveja, bebida maltada ou um aditivo alimentar. A alimentação humana ou animal, ou produto de cerveja pode ter reduzida alergenicidade e/ou aumento da digestibilidade. Além disso, um produto de massa pode ter um aumento de força e volume, em comparação com uma massa feita a partir de uma semente não-transgênica ou em grãos da mesma espécie. Os alimentos ou bebidas podem ter proteína hiperdigestível e/ou amido hiperdigestível. A alimentação humana ou animal ou bebida pode ser hipoalergênica.

O óleo extraído das plantas colhidas da invenção pode ser utilizado como matéria-prima para a modificação química, um componente de material biodegradável, um componente de um produto alimentar misturado, um componente de um óleo comestível ou óleo de cozinha, lubrificante ou um componente do mesmo, biodiesel, ou seu componente, um componente de um lanche, um processo de fermentação da matéria-prima, ou um componente de cosméticos.

O material vegetal colhido da invenção também pode ser combinado com outros ingredientes para produzir um produto útil. Os ingredientes específicos incluídos em um produto serão determinados em função da utilização final do produto. Os produtos ilustrativos incluem alimentação animal, matéria-prima para a modificação química, materiais biodegradáveis, produ-

to de alimento misturado, óleo comestível, óleo de cozinha, lubrificante, matéria-prima de biodiesel, lanche, cosméticos, produtos de limpeza e composições detergentes (por exemplo, detergentes para a roupa, detergentes para lavar louça e limpeza de superfície dura) e matéria-prima para processo de fermentação. Os produtos que incorporam o material vegetal colhido aqui descrito também incluem total ou parcialmente completo suína, aves, gado e alimentos, alimentos para animais e produtos de alimentação humana, tais como salgadinhos extrudados, pães, como um agente de ligação alimentar, alimentos de aquacultura, misturas fermentáveis, suplementos para comida, bebidas esportivas, barras nutricionais dos alimentos, suplementos multivitaminas, bebidas dietéticas, alimentos e cereais. Os produtos que incorporam material de planta colhidas aqui descritos incluem, por exemplo, papelão, produtos de papel e materiais industriais. Estes produtos podem incorporar o material vegetal colhido ou podem incorporar uma forma processada ou extraída do material vegetal colhido (por exemplo, óleo, proteína, amido, etc extraído de material de planta colhida).

C. Característica Primária de Interesse

As características primárias de interesse incluem quaisquer características que melhorem ou facilitem a conversão de material vegetal colhido em um produto comercialmente útil, incluindo, por exemplo, o aumento ou alteração do teor de carboidratos e/ou distribuição, propriedades de fermentação melhorada, maior teor de óleo, maior teor de proteína, melhor digestibilidade e maior teor nutracêutico, por exemplo, aumento do teor de fitoesteróis, maior teor de tocoferol, maior teor de estanol ou maior teor de vitamina. As características primárias de interesse também incluem, por exemplo, um teor reduzido de um componente não desejado em um produto colhido, por exemplo, o ácido fítico, inibidores de tripsina de soja ou enzimas de degradação de amido, dependendo do uso final. As características primárias de interesse podem ser decorrentes de um ou mais genes variantes de ocorrência natural, um ou mais genes trans, ou uma combinação de ocorrência natural do gene(s) ou transgene(s) variante(s). Uma característica primária de interesse pode ser realizada em uma planta que não apresente

tal característica através da expressão heteróloga de uma sequência de ácido nucleico (ou seja, "transgene") associada com tal característica. Por "associada com uma característica de interesse" entende-se que a sequência de ácido nucleico pode, direta ou indiretamente contribuir para a existência de uma característica de interesse (por exemplo, aumento da degradação de celulose pela expressão heteróloga de uma enzima que degrada o amido ou aumento do acúmulo de amido por expressão heteróloga de uma sequência de ácido nucleico antissenso que inibe a atividade de uma enzima que degrada amido).

Um exemplo de uma característica primária de interesse inclui a digestibilidade e/ou composição nutricional. Para conseguir esta característica, um polipeptídeo ou uma enzima que exibe atividade "fitase" ou uma "fitase" pode ser expressa heterologamente em uma planta da invenção para melhorar a digestibilidade da planta e melhorar a alimentação e utilização de alimentos ou a sua eficiência de conversão (ou seja, através da melhoria da biodisponibilidade de proteínas e minerais, ou aumentando a absorção das mesmas, que poderiam ser ligadas por fitato). Fitases (mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolase: EC 3.1.3.8) são enzimas que hidrolizam fitatos (mio-inositol hexaquisfosfato) para mioinositol e fosfato inorgânico. Entre os polipeptídeos particularmente úteis para a prática desta invenção incluem, entre outros, D-mio-inositol-3-fosfato sintase, mio inositol-1-fosfato sintase (também designado INOI), fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase, sinalizando inositol polifosfato-5-fosfatase (SIP-110), monofosfatase mio-inositol-3, mio-inositol 1-3-4 trifosfato de 5/6 quinase, 1 D-mio-inositol trisfosfato 3-quinase, mio-inositol monofosfatase-1, inositol polifosfato 5-fosfatase, 1 D-mio-inositol trifosfato 3-quinase, fosfatidilinositol 3-quinase, fosfatidilinositol 4-quinase, fosfatidilinositol sintetase, proteína de transferência de fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4-5-bisfosfato 5-fosfatase, transportador de mio-inositol, fosfolipase C fosfatidilinositol específico e fitase de milho.

O aumento da digestibilidade e disponibilidade de nutrientes também pode ser alcançado em uma planta, reduzindo a extensão da ligação dissulfeto (ver WO 00/36126, depositado em 15 Dec. 1999). A expres-

são da redutase tioredoxina transgênica fornece um método para redução das ligações de dissulfeto em proteínas de sementes durante ou antes da transformação industrial (ver WO 0058453). Os grãos colhidos a partir destas plantas têm alterado a qualidade da proteína de armazenamento e são qualitativamente diferentes dos grãos normais durante o processamento industrial ou digestão animal (ambos designados por "processamento"). O aumento da atividade tioredoxina através da expressão do reductase tioredoxina transgênica também aumenta a solubilidade da proteína, e assim aumenta o rendimento nas frações de proteínas solúveis. Portanto, a expressão de redutase tioredoxina transgênica é um meio de alterar a qualidade do material (sementes) que passa por processamento de grãos, alterando a qualidade dos materiais derivados do processamento de grãos, maximizando o rendimento dos componentes das sementes específicas durante o processamento (aumento de eficiência), alterando métodos de transformação e criação de novos usos para as frações derivadas de sementes ou componentes de fluxos de moagem.

Além disso, as plantas que expressam um resultado heterólogo da enzima xilanase em uma característica primária de interesse que inclui aumento da digestibilidade de alimentos ou rações. As xilanases são enzimas hemicelulóticas que aumentam a desagregação das paredes das células vegetais, que levam a um melhor aproveitamento dos nutrientes pelo animal. Isso leva ao aumento da taxa de crescimento e conversão de alimentos. Além disso, a viscosidade dos alimentos que contém xilan pode ser reduzida.

Numerosos xilanases de micro-organismos fúngicos e bacterianos foram identificados e caracterizados. (Ver, por exemplo, U.S. . N° 5.437.992; Coughlin, M. P.; Biely, P. et al., Espoo 1993; P. Souminen and T. Reinikainen eds., Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8: 125-135 (1993); U.S. Publicação de Pedido de Patente N° 2005/0208178; e WO03/16654). Em particular, três xilanases específicos (XYL-I, XYL-II, and XYL-III) foram identificados em *T. reesei* (Tenkanen, et al., Enzyme Microb. Technol. 14:566 (1992); Torronen, et al., Bio/Technology

10: 1461 (1992); and Xu, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:718 (1998)).

Também é possível modificar a composição de polissacarídeos pela introdução e tradução de um ou mais genes que codificam uma enzima degradante de polissacarídeo. Tais plantas podem ser úteis para a geração,
 5 por exemplo, de matérias-primas para fermentação. As enzimas associadas a esta característica primária de interesse inclui: Enzimas de degradação de amido tais como α -amilases (EC 3.2.1.1), glucuronidasas (E.C. 3.2.1.131);
 10 exo-1-4- α -D glucanases tais como amiloglucosidasas e glucoamilase (EC 3.2.1.3), β - amilases (EC 3.2.1.2), α -glucosidasas (EC 3.2.1.20), e outros
 15 exo-amilases; e enzimas de desramificação de amido, tais como a) isoamilase (EC 3.2.1.68), pululanase (EC 3.2.1.41), e similares; b) celulases tais como exo-1-4-3-celobiohidrolase (EC3.2.1.91), exo-1-3- β -D-glucanase (EC 3.2.1.39), β -glucosidase (EC 3.2.1.21), endo- 1-4- β -glucanase (EC 3.2.1.4) e similares; c) endoglucanases tais como endo-1-3- β - glucanase (EC 3.2.1.6);
 20 d) L-arabinases, tais como endo-1-5- α -L-arabinase (EC 3.2.1.99), α -arabinosidasas (EC 3.2.1.55) e similares; e) galactanases tais como endo- 1-4- β -D-galactanase (EC 3.2.1.89), endo-1-3- β -D-galactanase (EC 3.2.1.90), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), β -galactosidase (EC 3.2.1.23) e similares; f) mananases, tais como endo-1-4- β -D-mananase (EC 3.2.1.78), β -manosidase (EC 3.2.1.25), α -manosidase (EC 3.2.1.24) e similares; g) xilanases, tais como endo-1-4- β -xilanase (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37), 1-3- β -D-xilanase, e similares; h) outras enzimas tais como α -L-fucosidase (EC 3.2.1.51), α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40), levanase (EC 3.2.1.65), inulanase (EC 3.2.1.7) e similares.

25 Outros genes associados com uma característica primária de interesse incluem as enzimas de codificação capazes de degradar ainda mais a maltose maltotriose e α -dextrinas obtidas a partir da primeira degradação do amido, incluem maltases, dextrinase- α , α -1-6-glicosidasas, glucoamilases (α -1-4-glucano glucohidrolases), e similares. A ação dessas enzi-
 30 mas resulta na formação da glicose.

Em outra modalidade da presente invenção, se desejado, um ou mais novas enzimas secundárias, que são capazes de modificar monossa-

carídeos, podem ser expressas em uma ou mais variedades presentes na mistura da invenção. Tais enzimas incluem, entre outros, glicose isomerase, invertase e similares.

Uma característica primária adicional de interesse inclui um aumento no acúmulo de amido em plantas. A taxa de síntese de amido é largamente determinada pela atividade de AGPase, a primeira enzima no caminho. A forma dessa enzima encontrada em folhas é ativada pelo ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA), um produto da fotossíntese, e inibida por fosfato inorgânico (P_i), que se acumula quando a taxa de fotossíntese diminui. Isso faz com que a produção de amido seja aumentada, por vezes, quando a fotossíntese é processada rapidamente e não há açúcares excedentes que sejam armazenados e reduzidos durante tempos fracos. As enzimas mutantes e AGPase bacteriana foram identificadas como não são sensíveis a 3-PGA e P_i, ignorando assim o mecanismo de regulação de controle da degradação do amido (Patentes U.S. 7.098.380 e 6.617.495). A expressão heteróloga dessas enzimas em plantas pode resultar no acúmulo de amido na planta.

É de particular interesse em materiais vegetais da colheita da presente invenção a expressão heteróloga de enzimas de degradação de amido, como amilase e glicoamilase no material vegetal colhido para uso final, por exemplo, a produção de etanol. As glucoamilases (α -l-4-glucan glucohidrolases, E.C.3.2.1.3.) são amidos que hidrolizam as carboidrases de forma externa. As glucoamilases catalisam a remoção de unidades de glicose sucessivas a partir de extremidades não-redutoras do amido ou oligo relacionadas e moléculas de polissacarídeo e podem hidrolisar ligações glicosídicas lineares e ramificadas do amido (amilose e amilopectina). As glucoamilases comerciais são enzimas muito importantes que têm sido usadas em uma ampla variedade de aplicações que requerem a hidrólise de amido. As glucoamilases podem ser fornecidas através da expressão heteróloga de glucoamilase em pelo menos uma variedade de materiais vegetais da colheita da invenção.

As glucoamilases são utilizadas para a hidrólise do amido para a produção de adoçantes de milho de alta frutose. Em geral, os processos de

hidrólise do amido envolvem o uso de alfa-amilases para hidrolisar o amido em dextrina e glucoamilases para hidrolisar as dextrinas em glicose. A glicose é então convertida em frutose por outras enzimas, tais como isomerases de glicose. A glicose produzida por glucoamilases também pode ser cristali-

5 zada ou utilizada nas fermentações para produzir efeito de outros produtos finais, como ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glutâmico, 1-3 propanodiol e outros. As glucoamilases são usadas na produção de álcool, como a produção de cerveja e produção de saquê. As glucoamilases também encontram uso na produção de etanol para combustível e para o consumo. Recen-

10 temente, as glucoamilases têm sido utilizadas em processos de baixa temperatura para a hidrólise de amido granular (não-cozido). As glucoamilases também são utilizadas na preparação de rações animais como aditivos alimentares ou como componentes dos alimentos líquidos para animais de pecuária. O termo "alfa-amilase (por exemplo, CE classe 3.2.1.1)" refere-se às

15 enzimas que catalisam a hidrólise de ligações alfa-1,4-glicosídicas. Estas enzimas também foram descritas como aquelas que afetam a endohidrólise ou exohidrólise de ligações 1,4- α -D-glucosídicas em polissacarídeos contendo 1,4- α -ligado D-glicose. Outro termo usado para descrever estas enzimas é "glicogenase". Algumas enzimas incluem enzimas alfa-1-4-glucan 4-

20 glucanohidrase glucanohidrolase.

Em uma modalidade, uma primeira colheita expressa glucoamilase, e uma segunda colheita expressa alfa-amilase. A colheita pode, opcionalmente, incluir uma ou mais variedades adicionais. Uma ou mais variedades adicionais podem apresentar uma terceira característica primária de in-

25 teresses, podem apresentar nenhuma característica primária de interesse, ou pode servir como um marcador de plantas. Uma variedade adicional incluída neste material vegetal colhido pode incluir uma planta com alto teor de amido que resulta, por exemplo, da expressão da AGPase mutante ou bacteriana. A variabilidade genética de ocorrência natural em plantas com me-

30 tabolismo alterado são também úteis no material vegetal misturado da invenção. Muitas dessas plantas carregam mutações nos genes que codificam as isoformas da síntese de amidos ou enzimas de degradação do amido.

Por exemplo, as plantas que foram identificadas como heterozigotos ou homozigotos para uma ou mais das ceras (wx), amilose extender (ae), dull (du), córnea (h), encolhido (SH), brittle (bt), farinhenta (FL), opaco(o), ou açucarados (su) alelos mutantes. Ver, por exemplo, Patente U.S. Nos. 5 4.428.972; 4.767.849; 4.774.328; 4.789.738; 4.789.557; 4.790.997; 4.792.458; 4.798.735; e 4.801.470, aqui incorporados para referência. Estas plantas podem ser usadas na sua forma nativa, ou podem ser modificadas para apresentar uma ou mais características adicionais primárias de interesse. Outras enzimas adicionais que podem ser usadas incluem proteases, como as 10 proteases fúngicas e bacterianas. As proteases fúngicas incluem, por exemplo, aquelas obtidas a partir de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* e *Rhizopus*, como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* e *M. miehei*. Outras enzimas incluem, mas não estão limitados a, celulases, como endoglucanases e celobiohidrolases; hemicelulases, como manases e arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55); 15 lipases (por exemplo, EC. 3.1.1.3), glicose oxidase, pectinases, xilanases, transglucosidases, alfa 1,6 glucosidases (por exemplo, EC. 3.2.1.20); esterases como ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.73) e acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72); e cutinases (por exemplo, E.C. 3.1.1.74).

É também objeto da presente invenção fornecer material vegetal 20 colhido que proverá um nível-alvo de duas ou mais características de interesse para utilização em várias aplicações finais. Por exemplo, uma porção do material vegetal que apresenta características animais melhoradas (por exemplo, aumento da digestibilidade, aumento do teor de nutrientes, e outros) e uma ou mais variedades adicionais apresentará liquefação melhorada 25 para uso em, por exemplo, conversão de etanol. É contemplada a possibilidade de que qualquer combinação de variedades de plantas que exibem qualquer número de características de interesse pode ser útil nos métodos da presente invenção, desde que as variedades estejam presentes na colheita em uma relação-alvo que é ideal para atingir o nível-alvo de cada uma 30 das características de interesse. A fonte da qual as sequências de DNA que codificam essas enzimas podem ser obtidas não é relevante, desde que a enzima esteja ativa no ambiente em que a enzima é expressa ou em que a

enzima expressa é alvo. A escolha das enzimas pode depender da especificidade de substrato e/ou o produto final desejado para uso final (por exemplo, as enzimas com propriedades melhoradas, como termoestabilidade, estabilidade ácida, e similares).

5 D. Características Secundárias de Interesse

Uma ou mais variedades podem exibir uma ou mais características secundárias de interesse. As características secundárias de interesse incluem características que são essencialmente benéficas para uma empresa de sementes, um agricultor, ou um processador de grãos, por exemplo, 10 resistência a herbicidas resistência do vírus, resistência a patógenos bacterianos, resistência a insetos e resistência a fungos. Ver, por exemplo, Patente U.S. N^{os} 5.569.823; 5.304.730; 5.495.071; 6.329.504; e 6.337.431. Uma característica secundária de interesse também pode ser aquela que aumenta o vigor ou produção da planta (incluindo as características que permitem 15 uma planta crescer em diferentes temperaturas, condições de solo e níveis de luz solar e precipitação), ou uma que permita a identificação de uma planta que exibe uma característica de interesse (por exemplo, o gene marcador de seleção, cor do revestimento da semente, etc).

Em algumas modalidades, uma ou mais das variedades de plantas 20 em uma composição de sementes da invenção apresentam resistência a herbicida. Diversos genes estão disponíveis, tanto transgênicos como não-transgênicos, que conferem resistência a herbicidas. A resistência a herbicida também refere-se à tolerância a herbicida. Os genes que conferem resistência a um herbicida que inibe o ponto de crescimento ou meristema, como 25 um imidazalinona ou uma sulfoniluréia pode ser apropriado. Os genes ilustrativos neste código de categoria para enzimas mutantes ALS e AHAS conforme descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os} 5.767.366 e 5.928.937. Patente U.S. n^{os} 4.761.373 e 5.013.659 são direcionadas às plantas resistentes a vários herbicidas imidazolinona ou sulfonamida. A patente U.S. n^o 30 4.975.374 refere-se a células vegetais e plantas que contêm um gene que codifica uma sintetase de glutamina mutante(GS) resistente a inibição por herbicidas que são conhecidos por inibir a GS, por exemplo, sulfoximina me-

tionina e fosfinotricina. A patente U.S. nº 5,162,602 divulga as plantas resistentes à inibição por herbicidas de ácido ariloxifenoxipropanóico e ciclohexadiona. A resistência é conferida por uma coenzima A carboxilase acetila alterada (ACCase).

5 Também são apropriados os genes para resistência a glifosato. Ver, por exemplo, Patente U.S. nº 4.940.835 e Patente U.S. nº 4.769.061. Patente U.S. nº 5.554.798 revela plantas de milho resistente ao glifosato transgênico, cuja resistência é conferida por um gene sintetase 5 enolpiruvil-3-fosfoshiquimato (EPSP).

10 Os genes de resistência a compostos fosfona como glufosinato de amônio ou fosfinotricina e piridinóxi ou ácido propiônico fenóxi e ciclohexanos também são apropriados. Ver aplicação européia nº 0 242 246. Ver também, Patente U.S. nº 5.879.903, 5.276.268 e 5.561.236.

Outros herbicidas adequados incluem aqueles que inibem a fotossíntese, como um triazina e benzonitrila(nitrilase). Ver, Patente U.S. nº 4.810.648. Outros herbicidas adequados incluem ácido 2,2-dicloropropiônico, setoxidim, haloxifop, herbicidas imidazolinonas, herbicidas sulfoniluréia, herbicidas triazolopirimidinae, herbicidas s-triazina e bromoxinil. Também apropriado são os genes que conferem resistência a uma enzima

15 protox, ou fornecer maior resistência a doenças de plantas; tolerância reforçada de condições ambientais adversas (reforços abióticos), incluindo, entre outros, seca, calor excessivo, frio excessivo ou excesso de salinidade do solo ou de extrema acidez ou alcalinidade; e alterações na arquitetura da planta ou de desenvolvimento, incluindo mudanças no tempo de desenvol-

20 vimento. Ver, por exemplo, Pedido de Patente U.S. Nº 20010016956, e Patente U.S. nº 6.084.155.

As proteínas inseticidas úteis para a invenção podem ser expressas em uma ou mais variedades do material vegetal colhido em uma quantidade suficiente para controlar as pragas de insetos, ou seja, quantida-

30 des que controlam insetos. Sabe-se que a quantidade de expressão da proteína inseticida em uma planta necessária para o controle de insetos pode variar dependendo da espécie de planta, tipo de inseto, os fatores ambien-

tais e similares. Os genes úteis para a resistência a insetos ou pragas incluem, por exemplo, genes que codificam toxinas identificadas nos organismos de *Bacillus*. Os genes que codificam as toxinas *Bacillus thuringiensis* (Bt) de diversas subespécies foram clonados e os clones recombinantes parecem
 5 ser tóxicos para lepidópteros, dípteros e larvas de insetos coleópteros (por exemplo, os diversos genes de endotoxinas delta, tais como CryIAa, CryIAb, CryIAc, CryIB, CryIC, CryID, CryIEa, CryIFa, Cry3A, Cry9A, Cry9C and Cry9B; bem como os genes que codificam proteínas inseticidas vegetativas como Vip1, Vip2 e Vip3). A lista completa das toxinas Bt pode ser encontra-
 10 da na internet www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

As características secundárias de interesse na presente invenção são úteis para controlar uma grande variedade de insetos, incluindo, entre outros, espiga de milho, vaquinhas, lagarta-roscas, lagarta de cereais, particularmente lagarta do cartucho e lagarta de beterraba, larva de elaterí-
 15 deo, pulgões, brocas do milho, especialmente as brocas do milho europeu, broca da cana-de-açúcar, broca de talo de milho, broca do milho sudoeste, etc.

Por várias razões, particularmente a gestão da resistência dos insetos potenciais de desenvolvimento da planta expressa proteínas inseticidas, é benéfico para expressar mais do que uma proteína inseticida (IP) na
 20 mesma planta. Pode-se expressar dois genes diferentes (tais como genes que codificam duas diferentes delta-endotoxinas derivadas de *Bacillus thuringiensis* que se ligam a diferentes receptores no intestino do inseto-alvo) nos mesmos tecidos, ou pode-se expressar seletivamente duas toxinas nos
 25 diferentes tecidos da mesma planta usando promotores específicos de tecido. Da mesma forma, uma planta pode ser transformada com constructos que codificam mais de um tipo de proteína inseticida para controle de vários insetos. Portanto, diversas variações podem ser construídas por aqueles versados na técnica.

30 E. Revestimento da Semente

Uma característica secundária adicional útil nas plantas da presente invenção é a cor do revestimento da semente. O "revestimento de se-

mente" é o restante de tegumentos exteriores de flores de plantas nas plantas dicotiledôneas ou pericarpos em plantas monocotiledôneas, e como tal é geneticamente idêntico à planta em que a semente é produzida. Esta "semente marcadora" pode ser usada para identificar a presença de uma variedade vegetal que apresenta uma característica primária de interesse, ou para distinguir as sementes que contenham a característica primária de interesse e/ou a partir de sementes que contenham uma característica primária de interesse diferente. A cor do revestimento de semente pode estar associada a um gene hereditário que codifica a cor do revestimento da semente, ou pode ser aplicada às sementes na unidade de processamento de sementes ou para o grão colhido na unidade de processamento, ou quaisquer de suas combinações. Quando a cor de revestimento da semente for hereditária, a semente marcadora deve apresentar a mesma resistência ao herbicida, e de preferência a mesma resistência a pragas, resistência, como as outras variedades na mistura para assegurar a sua propagação. Um gene que codifica a cor do revestimento da semente pode ser geneticamente ligado a um gene associado com a característica primária de interesse (por exemplo, sob o controle do mesmo promotor) e, assim, expressa na variedade que apresenta a característica de interesse, pode ser expresso em uma variedade que apresenta a característica de interesse sem ser geneticamente ligada ao gene associado com a característica primária (por exemplo, integrados em um local distante no genoma da planta a partir do gene associado com a característica), ou pode ser expressa em uma variedade que não apresenta a característica de interesse. Portanto, o material vegetal colhido pode incluir uma primeira variedade que apresenta uma característica primária de interesse, uma segunda variedade que não apresente nenhum ou uma característica primária diferente de interesse, e uma terceira variedade que não apresente a característica primária de interesse, mas não possua uma cor de revestimento de semente diferente. Em uma modalidade, a cor do revestimento da semente pode ser obtida pela seleção de variedades em que se apresentam a característica de interesse. Dentro de algumas espécies de plantas existem cultivares com diferentes revestimentos de sementes colori-

dos. Por exemplo, na soja, existem dois genes que determinam a cor das sementes. As sementes são em preto, marrom, amarelo ou salpicado escuro sobre um fundo mais claro, dependendo da relação dominante/recessivo dos genes. Assim, o uso de uma variedade de revestimentos de semente coloridas (preto ou marrom ou salpicado no caso da soja) para uma plataforma transgênica permitirá a distinção de quaisquer sementes transgênicas dentro de uma quantidade maior de sementes. No contexto da cor do revestimento de sementes, o termo "transgênico" refere-se a qualquer planta ou parte da planta em que um gene heterólogo foi introduzido. A planta transgênica pode ser transgênica, quer para uma característica primária ou secundária de interesse ou ambas.

Pode-se também criar plantas transgênicas com uma de revestimento de sementes distinguível através da introdução de genes heterólogos nessas variedades de plantas que dão origem às sementes com cores selecionadas do grupo que consiste de: azul, vermelho, vermelho, branco e azul, ameixa, marrom; chinmark, púrpura, rosa, rosa para rosa-escuro, laranja, e várias combinações dessas cores que permitirá a distinção de qualquer semente transgênica dentro de uma quantidade maior de sementes. A cor da semente pode ser medida utilizando um espectrofotômetro de reflexão de luz visível (VLS) technicon calibrado para determinar a reflexão de luz total de 400 a 800 nanômetros. Esta configuração de comprimento de onda permite a separação do amarelo do marrom das sementes pretas. Alternativamente, a tecnologia de digitalização óptica pode ser usada para diferenciar sementes com base na cor. Ambos VLS e rastreamento óptico podem ser estabelecidos para análise de elevado rendimento. Em outra modalidade, a cor da semente pode ser obtida pela adição na superfície de corantes de revestimento da semente como micropartículas. As micropartículas são utilizadas para marcar uma ou mais variedades em uma composição da semente. As micropartículas aderidas às sementes individuais de uma variedade especial permitem uma pronta identificação de tal variedade. Uma série específica de tipos de micropartículas pode ser utilizada, cada série adere as sementes de uma determinada variedade. Alternativamente, um único tipo

de micropartículas pode ser usado, tal tipo se adere às sementes de apenas uma das variedades em uma composição de sementes. Em algumas modalidades, as sementes de pelo menos uma das variedades têm uma cor de revestimento que difere de pelo menos uma das variedades, por exemplo, as sementes da primeira e terceira variedades possuem a mesma cor do revestimento de sementes e as sementes da segunda variedade possuem uma cor de revestimento que difere da cor do revestimento de sementes da primeira e terceira variedades. Em algumas modalidades, não é necessário que todas as sementes de uma variedade especial sejam marcadas dessa maneira. Em vez disso, uma parte das sementes dessa variedade pode ser marcada para indicar a presença de sementes transgênicas dentro desse lote de sementes. Em outra modalidade, o corante de revestimento é adicionado ao grão colhido de forma que os grãos contendo a característica primária de interesse é distinta dos grãos que não contém característica de interesse e/ou a partir dos grãos contendo uma característica diferente de interesse. Em ainda outra modalidade, o corante de revestimento é aplicado a todos os grãos colhidos para a mistura de modo que o grão que contém a característica e o grão que não contém seja indistinguível.

As micropartículas com uma única camada colorida podem ser usadas, reconhecendo que algumas cores podem não ser adequadas para cores do revestimento especial de sementes. Por exemplo, uma micropartícula tan tornaria difícil a identificação se a variedade marcada possuísse uma cor de revestimento da semente tan. Podem ser utilizadas micropartículas com duas camadas coloridas. As micropartículas de camada dupla podem frequentemente fornecer uma diversidade suficiente de combinações de cores.

Em alternativa, uma partícula de 5 camadas pode ser utilizada. Se desejado, as micropartículas podem incluir intensificadores visuais Os intensificadores visuais apropriados incluem, sem limitação, corantes perolizados, glitters, pigmentos flocos de metal e microesferas de vidro. Os intensificadores visuais podem fornecer micropartículas com alta reflexão localizada e aparência mais característica, tornando a camada(s) colorida(s) de

micropartículas mais facilmente distinguível. Os intensificadores visuais também podem diferenciar as camadas coloridas de um tipo de micropartícula a partir de outro tipo de micropartícula. Por exemplo, um intensificador visual pode ser acrescentado para distinguir uma cor secundária (ou seja, laranja, verde e roxo) de outra cor secundária. As micropartículas podem ser combinadas com um aglutinante, por exemplo, um adesivo ou formulação de revestimento. Os materiais aglutinantes apropriados são conhecidos. A mistura adesiva/partícula resultante pode, por exemplo, em seguida, ser aplicada na superfície das sementes individuais para fins de identificação.

Uma semente marcadora pode ser observada para determinar a presença ou ausência de micropartículas. Se as micropartículas estiverem visíveis a olho nu, o exame pode ser realizado sem equipamento adicional. Para as micropartículas que não são visualizadas a olho nu, podem ser usados equipamentos como microscópio de luz ou lupa. Em geral, as micropartículas podem ser examinadas utilizando um microscópio comum 40X ou 100X.

Como uma alternativa para as características distinguíveis visualmente, a(s) camada(s) de diferentes tipos de micropartículas podem ser distinguidas por características que podem ser lidas por máquina. As características que podem ser lidas pela máquina podem incluir características magnéticas, características de absorção de infravermelho ou ultravioleta, características de reflexão infravermelha ou ultravioleta ou características de transmissão de luz visível ou fluorescência. Alternativamente, ou adicionalmente, uma ou mais variedades de sementes (ou qualquer parte delas) podem conter um marca molecular inerte distinguível, como o benzenos substituídos por halogênio ligados a ésteres terc-butila tag-linear descritos, por exemplo, em Orlenmeyer et al (1993) Proc. Natl Acad. Sci USA 90: 10922-10926 e Patente U.S. Nº 6.338.945 que foi incorporada aqui para referência em sua integralidade. Nesta modalidade, uma variedade de sementes contém uma marca única que seja detectada, por exemplo, utilizando-se cromatografia em fase gasosa, UV, luz visível e NIR e outros métodos espectroscópicos. Outro(as) variedades na mistura pode(m) incluir uma marca molecular

diferente ou pode(m) conter nenhuma marca molecular. Outra alternativa para característica visualmente distinguível contendo grãos que não possuem nenhuma característica ou sementes é a inclusão de dispositivos de identificação por radiofrequência (RFID) e/ou microbarcodes de vidro [Dejneka et al. (2003) PNAS 100 (2), 389] dentro da semente ou grão colhido. Esses RFID e/ou microbarcodes de vidro podem ser incluídos manualmente no contêiner de entrega de grãos ou sementes para identificar a semente que contém característica nos exemplos acima. RFID e/microbarcodes de vidro podem também ser usados para identificar o material vegetal colhido contendo a(s) característica(s) primária(s) de interesse. Em ambos os casos, um RFID e/ou leitor de microbarcodes de vidro pode ser usado para diferenciar a semente ou grão que contém a característica.

F. Plantas

As plantas úteis na presente invenção incluem plantas que são transgênicas, pelo menos, um gene associado com a característica primária de interesse, bem como as plantas que exibem a característica primária de interesse devido à presença de um gene de ocorrência natural ou através de um gene resultante da mutação ou variação natural de um gene endógeno associado a característica. Estas plantas podem ser obtidas através de fontes comerciais ou podem ser geradas usando os métodos de transformação aqui descritos. As plantas que não apresentam uma característica primária de interesse também podem ser incluídas no material vegetal colhido em um nível predeterminado (por exemplo, a relação-alvo para essa variedade). O tipo de planta selecionada depende de uma variedade de fatores, incluindo, por exemplo, a utilização final do material vegetal colhido, receptividade das espécies de plantas de transformação, e as condições em que as plantas serão cultivadas, colhidas e/ou processadas. Aqueles versados na técnica reconhecerão que os fatores adicionais para a seleção de variedades de plantas adequadas para o uso na presente invenção incluem alto potencial produtivo, boa resistência do caule, a resistência a doenças, tolerância à seca, rápida secagem e qualidade dos grãos suficiente para permitir o armazenamento e envio para mercado com perda mínima. Embora não seja ne-

cessário usar o mesmo híbrido (ou variedade) de plantas para as plantas que contém características e não contém características, é preferível a utilização de variedades com a mesma altura e tempo de polinização. No entanto, é também contemplado que as variedades que diferem em altura e/ou tempo de polinização podem ser usadas para otimizar o nível-alvo da(s) característica(s) de interesse no material da planta final colhida.

Para as plantas com alta qualidade nutricional, diversas variedades de milho estão disponíveis, tais como aquelas com altos níveis de lisina (Crow's Hybrid Corn Company, Milford, 111.), proteína (BASF) e óleo (Pfister Hybrid Corn Company, El Paso, 111. sob a marca KERNOIL®). Outros óleos de milhos adequados incluem as populações de milho conhecidas como Illinois High Oil (IHO) e Alexander High Oil (Alexo), as amostras que estão disponíveis na Universidade de Illinois Maize Genetics Cooperative-Stock Center (Urbana, 111.).

O milho doce também está disponível no qual há uma redução na quantidade de amido e um aumento na quantidade de glicose, sacarose e/ou polissacarídeos solúveis em água, normalmente encontrados na semente de milho imaturo (Creech, R. and Alexander, D. E. In Maize Breeding and Genetics; D. B. Walden, Ed.; John Wiley and Sons: New York, 1978; pp. 249-264). Em diversas espécies de plantas tais como milho (Shannon & Garwood, 1984), ervilha (Bhattacharyya et al., 1990), batata (Hovenkamp-Hermelink et al., 1987), Arabidopsis (Caspar et al., 1985; Lin et al., 1988a; Lin et al., 1988b) e tabaco (Hanson et al., 1988), foram encontrados mutantes com composição de carboidratos alterados. A costela marrom (Bmr) tem sido utilizada como alternativa para melhorar a digestibilidade dos híbridos silage a décadas. A melhora no consumo e digestibilidade ruminal é derivada do teor reduzido de lignina em híbridos Bmr mutantes. As variedades complementares, ambos de ocorrência natural e transgênicas, com características desejadas que são úteis para o processamento final como aqui descritas são bem conhecidas por aqueles versados na técnica.

As plantas úteis na presente invenção incluem, entre outros, colheitas que produzem flores comestíveis como couve-flor (*Brassica oleracea*).

a), alcachofra (*Cynara scolymus*), e cártamo (*Carthamus*, e.g. *tinctorius*); frutas tais como maçã (*Malus*, por exemplo, *domesticus*), banana (*Musa*, por exemplo, *acuminata*), berries (tais como groselha, *Ribes*, por exemplo, *rubrum*), cherries (tais como cerejas, ameixa, por exemplo, *avium*), pepino (5 *Cucumis*, por exemplo, *sativus*), uva (*Vitis*, por exemplo, *vinifera*), limão (*Citrus limon*), melão (*Cucumis melo*), nozes (tais como nozes, *Juglans*, por exemplo, *regia*; amendoim, *Arachis hypogaeae*), laranja (*Citrus*, por exemplo, *maxima*), pêssego (ameixa seca, por exemplo, *pérstica*), pêra (*Pyrus*, por exemplo *communis*), pimentão (*Solanum*, por exemplo, *capsicum*), ameixa (10 *Prunus*, por exemplo, *domestica*), morango (*Fragaria*, por exemplo, *moschata*), tomate (*Lycopersicon*, por exemplo *esculentum*), folhas, como a alfafa (*Medicago*, por exemplo *sativa*), cana-de-açúcar (*Saccharum*), couve (como *Brassica oleracea*), endívia (*Cichoreum*, por exemplo, *endívia*), alho-poró (*Allium*, por exemplo, *porrum*), alface (*Lactuca*, por exemplo, *sativa*), (15 *Spinacia*, por exemplo, *oleraceae*), tabaco (*Nicotiana*, por exemplo, *tabacum*); raízes, como a araruta (*Maranta*, por exemplo, *arundinacea*), beterraba (*Beta*, por exemplo, *vulgaris*), cenoura (*Daucus*, por exemplo, *carota*), mandioca (*Manihot*, por exemplo, *esculenta*), nabo (*Brassica rapa*, por exemplo), rabanete (*Raphanus*, por exemplo *sativus*) inhame (*Dioscorea*, por exemplo, *esculenta*), batata-doce (*Ipomoea batatas*); sementes, como feijão (20 *Phaseolus*, por exemplo, *vulgaris*), ervilha (*Pisum*, por exemplo, *sativum*), soja (*Glycine*, por exemplo, *max*), trigo (*Triticum*, por exemplo, *aestivum*), cevada (*Hordeum*, por exemplo, *vulgare*), milho (*Zea*, por exemplo, *mays*), arroz (*Oryza*, por exemplo, *sativa*), gramíneas, como capim eulália (*Miscanthus*, por exemplo, *giganteus*) e switchgrass (*Panicum*, por exemplo, *virgatum*), tais como árvores de álamo (*Populus*, por exemplo, *tremula*), pinheiro (*Pinus*); arbustos, como o algodão (por exemplo, *Gossypium hirsutum*) e tubérculos, como a couve-rábano (*Brassica*, por exemplo, *oleraceae*), batata (25 *Solanum*, por exemplo, *tuberosum*) e similares.

30 G. Métodos para Otimizar a Relação de Colheitas

O processo de registro existente da mistura otimizada da colheita contendo características e colheitas padrões (por exemplo, não contendo

característica) é baseado na mistura física no ponto de entrada no processo, como a instalação de um produtor de grãos, elevador de grãos ou instalações de processamento. Esse processo exige um capital extra sob a forma de armazenamento de grão extra e equipamentos de mistura. Em alguns
5 processos, a matéria-prima deve ser homogênea e uniforme. Utilizando a invenção atual, a colheita resultante de tal invenção resultará em um grão uniforme e homogêneo contendo a quantidade prescrita de uma ou mais características primárias de interesse.

Outros métodos dependem de esterilidade masculina na colheita
10 padrão para criar a polinização controlada no campo de produção agrícola. Este caso exige que 100% da colheita que contém a característica. Quando essa polinização controlada não ocorre devido à seca ou outros fatores, o nível exigido da característica primária de interesse (como o óleo de grãos ou de proteína) não é alcançado. Na invenção atual, a colheita resultante
15 não exige 100% do material vegetal com característica positiva. Pelo contrário, é necessário apenas para a colheita que contém uma quantidade de material vegetal de característica positiva que é suficiente para o uso final. Por exemplo, para fins de fermentação, é benéfico utilizar uma colheita que expresse uma ou mais enzimas celulase. No entanto, uma quantidade suficien-
20 te de enzima celulase pode ser fornecida no processo de fermentação por menos que 100% de material vegetal que expressa celulase. Por exemplo, uma quantidade suficiente de enzima celulase pode ser fornecida para o processo de fermentação, quando apenas cerca de 0,1% da colheita expressa celulase, ou apenas cerca de 1%, cerca de 5%, cerca de 10%, cerca
25 de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95%, ou cerca de 99% da colheita.

Quando mais de uma característica primária de interesse é desejável em uma colheita útil para fins de a jusante, pode ser necessário for-
30 necer material vegetal apresentando cada uma das características desejadas. No entanto, em alguns casos, pode ser difícil atingir o nível-alvo de expressão de cada gene associado com as características de interesse na

mesma planta. Quando o nível-alvo não pode ser alcançado em uma única variedade, múltiplas variedades, cada uma exibindo um ou mais característica(s) de interesse, podem ser combinadas em uma relação-alvo necessária para atingir o nível-alvo de cada uma das características primárias de interesse necessárias para o uso final.

O nível-alvo de cada característica primária de interesses é calculado com base na utilização final e leva em consideração uma variedade de fatores, incluindo, entre outros, a produtividade das plantas, o nível ou a expressão da característica primária de interesse em uma planta ou parte da planta, do tipo de planta utilizada, condições de crescimento para as plantas e processos envolvidos na conversão do material vegetal colhido para um produto útil (por exemplo, alimentos, alimentação, álcool industrial, biocombustíveis, produto de fermentação, etc).

Assim, em algumas modalidades, as sementes para duas ou mais variedades são misturadas na relação que resulta no nível mínimo (por exemplo, alvo) da característica no material vegetal colhido que é necessário para uma aplicação final. Prevê-se que uma ou mais características de interesse podem realmente estar presentes no material vegetal colhido em um nível-alvo mais elevado sob condições de crescimento determinado. O nível mínimo pode ser calculado através do plantio de cada variedade na mistura sob diferentes condições de crescimento (clima, localização geográfica, etc) e medido o nível de característica obtido sob cada condição.

Em outras modalidades, uma mistura personalizada adequada para o crescimento sob condições específicas pode ser desenvolvida. Para desenvolver uma mistura personalizada para um determinado uso final, os fatores que afetam o nível de característica em material vegetal colhido (discutido acima) devem ser considerados nas etapas de desenvolvimento e otimização para alcançar um produto comercialmente útil.

Na primeira etapa deste processo de desenvolvimento de uma mistura de sementes personalizada, o fornecedor de sementes deve se envolver em discussões com uma ou mais entidades ("colaboradores") envolvidos no desenvolvimento da mistura personalizada. Estas entidades podem

incluir um usuário da mistura de sementes (por exemplo, um agricultor) ou um usuário do produto colhido (ou seja, um "usuário final", por exemplo, uma entidade comercial), ou ambos, mas será principalmente o usuário final. O(s) colaborador(es) deve(m) definir a utilização final e fornecer informações relativas aos processos de fabricação necessários para converter a colheita para o produto final pretendido. Por exemplo, uma instalação de produção de etanol interessada em desenvolver uma mistura personalizada para fermentação de matérias-primas que forneceriam informações relativas à transformação química e/ou processos de fermentação envolvidos na conversão do cultivo de etanol, incluindo as condições de reação e materiais necessários para cada etapa na conversão. A formulação geral da característica necessária nos processos finais é desenvolvida nesta fase. Para a produção de etanol, poderá ser determinado que uma combinação de determinadas enzimas celulase seja necessária na colheita. Outros fatores logísticos, como as condições de crescimento das plantas e dos padrões de fluxo de colheita ao produtor e/ou distribuidor da colheita serão discutidos e considerados nesta fase.

A próxima fase envolve o desenvolvimento e testes de laboratório. O desenvolvimento em laboratório pode incluir, por exemplo, o desenvolvimento de novas plantas que exibem a(s) característica(s) de interesse, determinando várias propriedades moleculares e/ou bioquímicas destas plantas ou enzimas/ácidos nucleicos expressos nessas plantas (incluindo o nível de expressão relativa nas plantas, bem como a atividade da característica ou planta contendo características de processos finais), otimização de enzimas ou ácidos nucleicos para a utilização nessas plantas, estabelecendo uma ampla gama da administração viável para atingir o nível-alvo de cada característica na colheita. O "nível-alvo" ou "nível predeterminado" é o nível da característica necessário para a colheita de utilização final pretendida.

Após os testes de laboratório, o processo de escala piloto é utilizado para a comprovação de conceito e redução do intervalo e otimização do nível-alvo para cada característica de interesse, bem como as condições para o crescimento e para os processos finais. Por "prova de conceito" en-

tende-se que a colheita das plantas produzidas da mistura de sementes personalizadas é suficiente para o uso final pretendido. A quantidade de sementes necessária para produzir uma colheita com o nível-alvo de uma característica primária de interesse é calculada conforme a proporção do material vegetal total (ambas contendo características ou não contendo características) necessárias para a utilização final pretendida. Por exemplo, se um produtor de etanol pretende utilizar 1 tonelada da colheita para a conversão de etanol, a quantidade de colheita contendo características necessárias para esta conversão será menor do que 100% do total da colheita. A quantidade de sementes necessária para produzir esse percentual de colheita é aqui referido como a "relação pré-determinada" ou "relação-alvo".

Nesta fase, é possível começar a definir os pontos de valor para a utilização da mistura de sementes personalizadas, tais como redução de custos para o usuário final que resultar da utilização de uma mistura otimizada para a utilização final pretendida. Os pontos de valor podem ser relacionados, por exemplo, para a eficiência do processo, devido à combinação de características na colheita (incluindo a característica própria e/ou o nível de característica utilizado) ou diminuição dos custos envolvidos na utilização de uma colheita que contenha menos de 100% de plantas com características positivas. Para o produtor de sementes, é possível avaliar o investimento de capital necessário para fornecer a mistura personalizada, que pode ser usada para desenvolver estruturas de custos e margens de lucro adequadas para o serviço.

O processo de escala comercial em que a escala de produção plena é executada por um período de tempo limitado é então utilizado para validar o nível-alvo de características necessárias para a mistura personalizada. Outros aperfeiçoamentos das condições relacionadas com o crescimento e/ou processamento também podem ser feitos nesta fase. Será necessária a coordenação da oferta de colheita, armazenamento e transporte, assim como a fabricação de outros fatores logísticos necessários para a utilização comercial plena da mistura personalizada. As variáveis realizadas a partir deste processo (como o nível-alvo, a relação-alvo, pontos de valor, etc)

podem ser utilizadas para desenvolver misturas customizadas para outros usuários finais ou para outros usos finais.

H. Métodos de Geração de Sementes que Compreendem Características de Interesse

- 5 As plantas que apresentam características primárias e secundárias de interesse, em combinação com outras características importantes para a produção e qualidade, podem ser incorporadas em linhas de plantas através da criação ou tecnologias de engenharia genética comuns. As técnicas e métodos de criação são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo,
- 10 Welsh J. R., *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley & Sons, NY (1981); *Crop Breeding*, Wood D. R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Second Edition, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D. P., *Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests*, Springer-Verlag, NY (1986); and
- 15 Wricke and Weber, *Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding*, Walter de Gruyter and Co., Berlin (1986).

As técnicas pertinentes são bem conhecidas na técnica e incluem a hibridação, a consanguinidade, reprodutores de retrocruzamento, multi-
linhagem, endogamia diaplóides, mistura de variedades, hibridação interes-
20 pecífica, técnicas aneuplóides, etc. As técnicas de hibridização também incluem a esterilização de plantas para produção de plantas machos ou fêmeas estéreis por meios mecânicos, químicos, genéticos (incluindo transgênicos) ou bioquímicos.

Em algumas modalidades, pode ser necessário modificar geneti-
25 camente as plantas para obter uma característica de interesse utilizando métodos de rotina de engenharia de plantas. Neste exemplo, um ou mais ácidos nucleicos associados com a característica de interesse podem ser introduzidos na planta. As plantas podem ser homozigotos e heterozigotos para a sequência de ácidos nucleicos. A expressão desta sequência (ou transcrição
30 e/ou tradução) resulta em uma planta que apresenta a característica de interesse. A expressão dessa sequência de ácido nucleico heterólogo pode resultar em aumento ou inibição da atividade de um gene endógeno ou proteí-

na, ou pode conferir uma nova propriedade para a planta. Os métodos para aumentar ou inibir a atividade de um gene ou a proteína-alvo são bem conhecidos na técnica.

Para obter uma planta que apresenta uma característica de interesse particular, pode ser necessária para inibir ou aumentar a expressão ou atividade de um gene endógeno em tal planta. Os termos "inibir", "inibição" e "inibindo", usado aqui refere-se a uma diminuição na expressão ou função de um produto de gene-alvo, incluindo qualquer diminuição relativa na expressão ou função até e inclusive a revogação completa de expressão ou função do produto de gene-alvo. Da mesma forma, os termos "melhorar" ou "aumentar", como aqui utilizados refere-se a um aumento na expressão ou função do produto do gene-alvo, incluindo qualquer incremento relativo na expressão ou função do produto de gene-alvo. O termo "expressão", usado aqui no contexto de um produto do gene refere-se à biossíntese de que o produto do gene, incluindo a transcrição e/ou tradução e/ou montagem do produto de gene. A inibição ou aumento de expressão ou função do produto do gene-alvo (ou seja, um produto do gene de interesse) pode ser no contexto de uma comparação entre as duas plantas, por exemplo, a expressão ou função do produto do gene-alvo em uma planta geneticamente modificada versus a expressão ou função do produto do gene-alvo em uma planta correspondente tipo selvagem. Alternativamente, a inibição da expressão ou função do produto do gene-alvo pode ser no contexto de uma comparação entre as células vegetais, organelas, órgãos, tecidos ou partes de plantas dentro da mesma planta ou entre plantas, e inclui comparações entre as fases de desenvolvimento ou temporais dentro da mesma planta ou entre plantas.

Cassetes de Expressão de Plantas

Uma variedade de plantas exibindo uma característica de interesse pode ser obtida através da introdução de uma sequência de ácidos nucleicos de uma planta associados com uma característica de interesse. As sequências de ácido nucleico podem ser apresentadas em constructos de DNA ou cassetes de expressão. "Cassete de expressão" usado aqui signifi-

ca uma molécula de ácido nucleico capaz de direcionar uma expressão de uma sequência de nucleotídeos particulares em uma célula hospedeira apropriada, compreendendo um promotor operativamente ligado à sequência de nucleotídeos de interesse (ou seja, uma sequência de ácidos nucleicos

5 associados com uma característica de interesse, ou uma sequência de ácido nucleico capaz de inibir a função de uma proteína-alvo, onde a inibição está associado com a característica de interesse) que é operativamente ligada a sinais de terminação. Também compreende, em geral, sequências necessárias para a tradução apropriada da sequência de nucleotídeos. A região de

10 codificação normalmente codifica uma proteína de interesse, mas também pode codificar para um RNA funcional de interesse, por exemplo, RNA antis-senso ou RNA não traduzido no sentido ou sentido contrário. O cassete de expressão compreendendo a sequência de nucleotídeos de interesse pode ser quimérica, o que significa que pelo menos um de seus componentes é

15 heteróloga em relação a pelo menos um dos seus outros componentes. O cassete de expressão também pode ser um que é de ocorrência natural, mas foi obtido em uma forma recombinante útil para expressão heteróloga. Normalmente, no entanto, o cassete de expressão é heterólogo com relação ao hospedeiro, ou seja, a sequência particular do DNA do cassete de ex-

20 pressão não ocorre naturalmente nas células do hospedeiro e deve ter sido introduzido na célula hospedeira ou de um ancestral da célula hospedeira por um evento de transformação. A expressão da sequência de nucleotídeos no cassete de expressão pode estar sob o controle de um promotor constitutivo ou de um promotor induzível que a transcrição inicia somente quando a

25 célula do hospedeiro é exposta a algum estímulo externo específico. Além disso, o promotor pode também ser específico para um determinado tecido ou órgão ou estágio de desenvolvimento. O cassete de expressão pode opcionalmente incluir uma região de terminação da transcrição e tradução (isto é, região de terminação) funcional em plantas. Em algumas modalidades, o

30 cassete de expressão com um gene marcador de seleção para permitir a seleção de transformantes estáveis. Os constructos de expressão da invenção podem também incluir uma sequência líder e/ou uma sequência que

permite a expressão induzida de polinucleotídeos de interesse. Ver, Guo et al. (2003) Plant J. 34:383-92 and Chen et al. (2003) Plant J. 36:731-40 para exemplos de sequências que permitem a expressão induzida.

As sequências regulatórias dos constructos de expressão são operativamente ligados à sequência de ácido nucleico de interesse. Por "operacionalmente vinculado" se destina uma ligação funcional entre um promotor e uma segunda sequência onde a sequência do promotor inicia e media a transcrição da sequência de DNA correspondente à segunda sequência. Geralmente, operavelmente ligado significa que as sequências de nucleotídeos a serem ligadas são contíguas.

Qualquer promotor capaz de conduzir a expressão na planta de interesse pode ser utilizado na prática da invenção. O promotor pode ser nativo ou análogo ou estrangeiro ou heterólogo à planta hospedeira. Os termos "heterólogos" e "exógenos", quando aqui utilizados para se referir a uma sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, uma sequência de DNA ou RNA) ou de um gene, refere-se a uma sequência que se origina de uma fonte externa à célula hospedeira particular ou, no caso da mesma fonte, é modificada da sua forma original. Assim, um gene heterólogo em uma célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira particular, mas foi modificado através, por exemplo, do uso da mistura de DNA. Os termos também incluem as diversas cópias de ocorrência natural de uma sequência de DNA de ocorrência natural. Portanto, os termos refere-se a um segmento de DNA que é estrangeiro ou heterólogo para a célula, ou homólogo para a célula, mas em uma posição dentro de um ácido nucleico da célula hospedeira em que o elemento não é normalmente encontrado. Os segmentos de DNA exógenos são expressos para produzir polipeptídeos exógenos.

Uma sequência de ácido nucleico "homólogo" (por exemplo, DNA) é uma sequência de ácido nucleico (por exemplo, DNA ou RNA) natural associada à célula hospedeira em que é introduzida. A escolha dos promotores a serem incluídos depende de vários fatores, incluindo, entre outros, eficiência, seletividade, inductibilidade, nível de expressão desejado e ex-

pressão preferencial de células ou tecidos. É uma questão de rotina para aqueles versados na técnica de modular a expressão de uma sequência adequada para os promotores de posicionamento e seleção e outras regiões reguladoras em relação a tal sequência.

5 Alguns promotores adequados para iniciar somente a transcrição, ou predominantemente, em certos tipos de células. Assim, aqui utilizado como um promotor preferencial de tecido ou tipo de célula é uma expressão preferencialmente no tecido-alvo, mas também pode levar a alguma expressão em outros tipos de células ou tecidos. Métodos de identificação e caracterização de regiões promotoras do DNA genômico de plantas incluem, por exemplo, aquelas descritas nas seguintes referências: Jordano, et al., *Plant Cell*, 1:855-866 (1989); Bustos, et al., *Plant Cell*, 1:839-854 (1989); Green, et al., *EMBO J.* 7, 4035-4044 (1988); Meier, et al., *Plant Cell*, 3, 309-316 (1991); and Zhang, et al., *Plant Physiology* 110: 1069-1079 (1996). Os promotores ativos no tecido fotossintético, a fim de direcionar a transcrição em tecidos verdes, como folhas e caules são também envolvidas pela presente invenção. Os promotores mais apropriados que a expressão única ou predominantemente em tais tecidos. O promotor pode conferir a expressão constitutiva em toda a planta, ou diferencial em relação aos tecidos verdes, ou de forma diferenciada em relação ao estágio de desenvolvimento do tecido verde em que a expressão ocorre, ou em resposta a estímulos externos.

Os exemplos de tais fatores incluem os promotores de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (RbcS), tais como o promotor de RbcS de larício oriental (*Larix laricina*), o promotor pinheiro cab6 (Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35:773- 778), o promotor gene Cab-1 a partir da farinha (Fejes et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:921-932), o promotor CAB-I de espinafre (Lubberstedt et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 104:997-1006), o promotor cab IR a partir do arroz (Luan et al. (1992) *Plant Cell* 4:971-981), o promotor piruvato ortofosfato diquinase (PPDK) de milho (Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9586-9590), o promotor tabaco Lhcbl*2 (Cerdan et al. (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:245-255), o promotor *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter (Truernit et al. (1995) *Planta* 196:564-570), e promoto-

res de proteína da membrana tilacóide a partir de espinafre (psaD, psaF, psaE, PC, FNR, atpC, atpD, cab, rbcS. Outros promotores que conduzem a transcrição em caules, folhas e tecidos verdes são descritos na Publicação Patente Nº 2007/0006346, incorporada aqui para referência em sua integridade.

Em algumas outras modalidades da presente invenção, os promotores induzíveis podem ser desejados. Os promotores induzíveis conduziram a transcrição em resposta a estímulos externos, tais como agentes químicos ou estímulos ambientais. Por exemplo, os promotores induzíveis podem conferir a transcrição, em resposta aos hormônios, como o ácido giberélico e etileno, ou em resposta a luz ou a seca.

Uma variedade de terminadores de transcrição está disponíveis para uso em cassetes de expressão. Estes são responsáveis pela terminação da transcrição além do transgene e poliadenilação mRNA correta. A região de terminação pode ser nativa com a região de iniciação de transcrição pode ser nativa com a sequência de DNA ligada operativamente de interesse pode ser nativa com a planta hospedeira, ou pode ser derivada de outra fonte (ou seja, estrangeira ou heteróloga para o promotor, a sequência de DNA de interesse, planta hospedeira ou qualquer combinação dos mesmos). Os terminadores de transcrição adequados são aqueles que são conhecido por funcionar em plantas e incluem o terminador CaMV 35S e o terminador tml, o terminador da sintase nopalina e o terminador peã rbcS E9. Estes podem ser usados tanto em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Além disso, o terminador de transcrição de um gene nativo pode ser usado.

Geralmente, o cassete de expressão compreende um gene marcador de seleção para a seleção das células transformadas. Os genes marcadores de seleção são utilizados para a seleção de células ou tecidos transformados.

Várias sequências parecem aumentar a expressão gênica de dentro da unidade de transcrição e estas sequências podem ser usadas em conjunto com os genes da presente invenção para aumentar a sua expressão em plantas transgênicas.

Várias sequências de íntrons foram mostradas para intensificar a expressão. Por exemplo, os íntrons do gene *Adhl* de milho foram encontrados para intensificar significativamente a expressão do gene do tipo selvagem em seu promotor cognato quando introduzidos em células de milho. O

5 íntron 1 mostrou-se particularmente eficaz e a expressão intensificada nos constructos de fusão com o gene cloranfenicol acetiltransferase (Callis et al., *Genes Develop.* 1: 1183-1200 (1987)). No mesmo sistema experimental, o íntron do bronze de milho 1 gene tem um efeito similar no aumento da expressão. As sequências de íntron foram rotineiramente incorporadas em ve-

10 tores de transformação de plantas, em geral, dentro do líder não-traduzido.

Diversas sequências líderes não-traduzidas derivadas de vírus também são conhecidas por aumentar a expressão. Especificamente, as sequências líderes do Vírus do mosaico do tabaco (TMV, a "sequência W"), Vírus do Mosaico Clorótico do milho (MCMV) e Vírus mosaico da alfafa

15 (AMV) tem demonstrado ser eficaz na intensificação da expressão (por exemplo, Gallie et al. *Nucl. Acids Res.* 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski et al. *Plant Molec. Biol.* 15: 65-79 (1990)). Outras sequências líderes conhecidas na técnica incluem, entre outros: Líderes picomavirus, por exemplo, líder EMCV (região de descodificação encefalomiocardite 5') (Elroy-Stein, O., Furst, T. R., and Moss, B. *PNAS USA* 86:6126- 6130 (1989)); líderes potivírus, por exemplo, líder TEV (Tobacco Etch Virus) (Allison et al., 1986); líder MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus); *Virology* 154:9- 20); líder proteína aglutinante de cadeia pesada na imunoglobina humana (BiP), (Macejak, D. G., and Samow, P., *Nature* 353: 90-94 (1991); líder não traduzido do mRNA da

25 proteína de revestimento do vírus mosaico da alfafa (AMV RNA 4), (Jobling, S. A., and Gehrke, L., *Nature* 325:622-625 (1987); líder de vírus mosaico do tabaco (TMV), (Gallie, D. R. et al., *Molecular Biology of RNA*, pages 237-256 (1989); e líder de vírus mosaico clorótico de milho (MCMV) (Lommel, S. A. et al., *Virology* 81:382-385 (1991). Ver também, Della- Cioppa et al., *Plant Physiology* 84:965-968 (1987).

30

Diversos mecanismos para segmentação dos produtos de genes são conhecidos como existentes nas plantas e as sequências de controle de

funcionamento desses mecanismos foram caracterizadas em detalhe. Por exemplo, a segmentação de produtos de genes para o cloroplasto é controlada por uma sequência de sinais encontradas na parte final amino de várias proteínas que é clivada durante a importação do cloroplasto para produzir a
5 proteína madura (por exemplo, Comai et al. J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988)). Essas sequências de sinais podem ser fundidas para produtos de genes heterólogos para efetuar a importação de produtos heterólogos no cloroplasto (van den Broeck, et al. Nature 313: 358- 363 (1985)). A codificação de DNA pelas sequências de sinais apropriadas pode ser isolada a partir
10 do final 5 'do cDNAs que codificam as proteínas RUBISCO, a proteína CAB, a enzima sintetase EPSP, a proteína GS2 e muitas outras proteínas que são conhecidas como cloroplastos localizados. Ver também a seção intitulada "Expression With Chloroplast Targeting" no exemplo 37 da Patente U.S. nº 5.639.949.

15 Os mecanismos descritos acima para alvo celular podem ser utilizados não somente conjuntamente com seus promotores cognatos, mas conjuntamente com promotores heterólogos para efetuar igualmente um objetivo de alvo-célula específico sob a regulação transcripcional de um promotor que tenha um padrão de expressão diferente daquele do promotor de que
20 o sinal alvo deriva.

A fim de assegurar a localização nos plastídeos é concebível usar um dos seguintes peptídeos de trânsito: Ferredoxin plastídico: NADP + Oxidorredutase (FNR) do espinafre que é encontrado em Jansen et al. (Current Genetics 13 (1988), 517 - 522). Em particular, a sequência que varia
25 dos nucleotídeos -171 a 165 da sequência de cDNA descrita aqui pode ser usada, que compreende a região não-traduzida 5' assim como a sequência que codifica o peptídeo de trânsito. Outro exemplo é o peptídeo de trânsito da proteína de milho ceroso que inclui os primeiros 34 resíduos de aminoácidos da proteína cerosa madura (Klosgen et al., Mol Gen Genet. 217 (1989)
30 (1989), 155-161). É igualmente possível usar este peptídeo de trânsito sem os primeiros 34 aminoácidos da proteína madura. Além disso, os peptídeos de sinal da subunidade pequena de bifosfato de ribulose carboxilase (Wolter

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846 - 850; Nawrath Et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 12760-12764), desidrogenase malat NADP (Galiardo et al., Planta 197 (1995), 324-332), redutase de glutathione (Creissen et al., Plant J. 8 (1995), 167-175) ou Lorberth et al. da proteína RI (Nature Biotechnology 16, (1998), 473-477) pode ser usada.

Transformação da Planta

Uma vez uma sequência de ácido nucleico associada com um traço preliminar ou secundário do interesse foi clonada em um sistema de expressão, ela é transformada em uma célula de planta. O receptor e os cassetes de expressão-alvo da presente invenção podem ser introduzidos na célula de planta em um número de maneiras técnico reconhecidas. O termo "introdução" no contexto de um polinucleotídeo, por exemplo, um constructo de nucleotídeo de interesse, é pretendido significar a apresentação à planta de polinucleotídeo de maneira tal que o polinucleotídeo ganhe acesso ao interior de uma célula de planta. Onde mais de um polinucleotídeo devem ser introduzidos, estes polinucleotídeos podem ser configurados como parte de um único constructo de nucleotídeo, ou como constructos de nucleotídeos separados, e podem ser localizados nos mesmos ou diferentes vetores de transformação.

Conformemente, estes polinucleotídeos podem ser introduzidos na célula hospedeira de interesse em um único evento de transformação, em eventos de transformação separados, ou, por exemplo, nas plantas, como parte de um protocolo de criação de animais. Os métodos da invenção não dependem de um método particular para introduzir um ou mais polinucleotídeos em uma planta, simplesmente aqueles polinucleotídeos ganham acesso ao interior de pelo menos de uma célula de planta. Métodos para introduzir polinucleotídeos em plantas são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, métodos de transformação transientes, métodos de transformação estáveis, e métodos mediados por vírus.

"Transformação transiente" no contexto de um polinucleotídeo é pretendido significar que um polinucleotídeo é introduzido na planta e não integra no genoma da planta.

Por "introdução estável" ou "introduzida/o estavelmente" no contexto de um polinucleotídeo introduzido em uma planta é pretendido o polinucleotídeo introduzido e é incorporado estavelmente no genoma da planta, e a planta é transformada estavelmente com o polinucleotídeo.

5 "Transformação estável" ou "transformado/a estavelmente" é pretendido significar que um polinucleotídeo, por exemplo, um constructo de nucleotídeo descrito aqui, introduzido em uma planta integra no genoma da planta e é capaz de ser herdado pela descendência do mesmo, mais particularmente, pela descendência de múltiplas gerações sucessivas.

10 Os numerosos vetores de transformação disponíveis para transformação da planta são conhecidos por aqueles versados na técnica de transformação da planta, e os genes pertinentes a esta invenção podem ser usados conjuntamente com uns vetores. A seleção do vetor dependerá da técnica de transformação preferida e das espécies alvo para a transformação.

15 Para determinadas espécies alvo, os marcadores de seleção diferentes de antibiótico ou herbicida podem ser preferidos. Os marcadores de seleção usados rotineiramente na transformação incluem o gene nptII, que confere resistência à canamicin e aos antibióticos relacionados (Messing & Vierra. Gene 19:259 - 268 (1982); Bevan et al., Nature 304:184 - 187 (1983)), o gene bar, que confere resistência ao herbicida de fosfinotricin (White et al., Nucl. Acids Res 18:1062 (1990), Spencer et al. Theor. Appl. Genet 79: 625 - 631 (1990)), o gene hph ou aph4, que confere resistência à higromicin antibiótico (Blochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4:2929 - 2931), e o gene dhfr, que confere resistência a metatrexato (Bourouis et al., EMBO J. 2(7):

20 1099-1104 (1983)), o gene EPSPS, que confere resistência a glifosato (Patente US Números 4.940.935 e 5.188.642), e o gene manose-6-fosfato isomerase, que fornece a habilidade para metabolizar manose (Patente US N^{os} 5.767.378 e 5.994.629).

Os métodos para a regeneração das plantas são igualmente conhecidos na técnica. Por exemplo, vetores de plasmídeo de Ti foram utilizados para a entrega de DNA estrangeiro, assim como a captação de DNA

30 direto, lipossomos, eletroporação, microinjeção, e microprojecteis. Além dis-

so, bactéria do gênero *Agrobacterium* pode ser utilizada para transformar células de planta. Estão abaixo as descrições de técnicas representativas para transformar ambas as plantas dicotiledônias e monocotiledônias, assim como uma técnica de transformação representativa de plastídeo.

5 Muitos vetores estão disponíveis para a transformação usando *Agrobacterium tumefaciens*. Estes carregam tipicamente pelo menos uma sequência fronteira de T-DNA e incluem vetores tais como pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)). Para a construção dos vetores úteis na transformação de *Agrobacterium*, veja, por exemplo, a publicação do Pedido de Pa-
10 tente US Nº 2006/0260011, aqui incorporada pela referência.

 A transformação sem o uso de *Agrobacterium tumefaciens* con- torna a exigência para sequências de T-DNA no vetor de transformação es- colhido e conseqüentemente os vetores que faltam estas sequências podem ser utilizados além dos vetores tais como esses descritos acima que contêm
15 sequências de T-DNA. As técnicas de transformação que não contam com *Agrobacterium* incluem a transformação através do bombardeio da partícula, da captação de protoplasto (por exemplo, PEG e eletroporação) e microinje- ção. A escolha do vetor depende da maior parte da seleção preferida para a espécie que está sendo transformada. Para a construção de tais vetores,
20 veja, por exemplo, Pedido US Nº 20060260011, aqui incorporado pela refe- rência.

 Para a expressão de uma sequência de nucleotídeo útil na pre- sente invenção em plastídeos de planta, o vetor de transformação de plastí- deo pPH143 (WO 97/32011, exemplo 36) é usado. A sequência de nucleotí-
25 deo é introduzida em pPH143 que substitui desse modo a sequência de co- dificação de PROTOX. Este vetor é então usado para a transformação de plastídeo e a seleção dos transformantes para a resistência de espectinomi- cin. Alternativamente, a sequência de nucleotídeo é introduzida em pPH143 de modo que substitua o gene *aadH*. Neste caso, os transformantes são se-
30 lecionados para a resistência aos inibidores de PROTOX.

 As técnicas de transformação para dicotiledons são bem conhe- cidas na área e incluem as técnicas baseadas em *Agrobacterium* e técnicas

que não exigem *Agrobacterium*. As técnicas não-*Agrobacterium* envolvem a captação de material genético exógeno diretamente pelos protoplastos ou células. Isto pode ser realizado por PEG ou captação mediada por eletroporação, entrega mediada por bombardeio de partícula, ou microinjeção. Os

5 exemplos destas técnicas são descritos por Paszkowski et al., *EMBO J.* 3:2717 - 2722 (1984), Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.* 199:169 - 177 (1985), Reich et al., *Biotechnology* 4:1001 - 1004 (1986), e Klein et al., *Nature* 327:70 - 73 (1987). Em cada caso as células transformadas são regeneradas às plantas inteiras usando as técnicas padrão conhecidas na área.

10 A transformação mediada por *Agrobacterium* é uma técnica preferida para a transformação de dicotiledons por causa de sua alta eficiência de transformação e de sua ampla utilidade com muitas espécies diferentes. A transformação de *Agrobacterium* envolve tipicamente a transferência do vetor binário que carrega o DNA estrangeiro de interesse (por exemplo,

15 pCIB200 ou pCIB2001) a uma cepa de *Agrobacterium* apropriada que possa depender do complemento de genes vir carregados pela cepa de *Agrobacterium* hospedeira ou um plasmídeo de Ti corresidente ou cromossomalmente (por exemplo, cepa CIB542 para pCIB200 e pCIB2001 (Uknes et al. *Plant Cell* 5: 159 - 169 (1993))). Transferência do vetor binário recombinante a *Agro-*

20 *bacterium* é realizada por um procedimento de acoplamento triparental usando *E. Coli* que carrega o vetor binário recombinante, uma cepa *E. Coli* ajudante que carrega um plasmídeo tal como pRK2013 e que possa ser capaz de mobilizar o vetor binário recombinante à cepa *Agrobacterium*-alvo. Alternativamente, o vetor binário recombinante pode ser transferido a *Agro-*

25 *bacterium* pela transformação de DNA (Hofgen & Willmitzer, *Nucl. Acids Res.* 16:9877 (1988)).

A transformação da espécie de planta-alvo pelo *Agrobacterium* recombinante geralmente envolve o cocultivo do *Agrobacterium* com os explantes da planta e segue protocolos bem conhecidos na técnica. Tecido

30 transformado é regenerado no meio selecionável que carrega o marcador de resistência de antibiótico ou herbicida presente entre as fronteiras de T-DNA de plasmídeo binário.

Uma outra aproximação às células de planta de transformação com um gene envolve propelir partículas ativas biologicamente ou inertes em tecidos de planta e células. Esta técnica é descrita na Patente US N^{os} 4.945.050, 5.036.006, e 5.100.792 todas a Sanford et al. Geralmente, este
5 procedimento envolve propelir partículas biologicamente ativas ou inertes nas células sob condições eficazes para penetrar a superfície exterior da célula e ter recursos para a incorporação dentro do interior das mesmas. Quando as partículas inertes são utilizadas, o vetor pode ser introduzido na célula revestindo as partículas com o vetor que contém o gene desejado.
10 Alternativamente, a célula-alvo pode ser cercada pelo vetor de modo que o vetor é carregado na célula pela vigília da partícula. As partículas biologicamente ativas (por exemplo, células de levedura secas, bactéria seca ou um bacteriófago, cada um contendo DNA de contenção a ser introduzido) podem igualmente ser propelidos no tecido de célula de planta.

15 A transformação da maioria das espécies de monocotiledon agora igualmente tornou-se rotineira. As técnicas preferidas incluem transferência direta do gene nos protoplastos usando PEG ou técnicas de eletroporação, e bombardeio da partícula no tecido callus. As transformações podem ser empreendidas com uma única espécie de DNA ou múltiplas espécies de
20 DNA (isto é, cotransformação) e ambas dessas técnicas são apropriadas para o uso com esta invenção. Cotransformação pode ter a vantagem de evitar a construção de vetor completa e de gerar plantas transgênicas com locus não ligado para o gene de interesse e marcador selecionável, permitindo a remoção do marcador selecionável em gerações subsequentes, se
25 este for considerado desejável. Entretanto, uma desvantagem do uso da cotransformação é a frequência menos de 100% com que as espécies separadas de DNA são integradas no genoma (Schocher et al. Biotechnology 4:1093 - 1096 (1986)).

Pedidos de Patente EP 0 292 435, EP 0 392 225, e WO
30 93/07278 descrevem técnicas para a preparação de callus e protoplastos de uma linha pura elite de milho, transformação de protoplastos usando PEG ou eletroporação, e a regeneração de plantas de milho dos protoplastos trans-

formados. Gordon-Kamm *et al.* (*Plant Cell* 2:603 - 618 (1990)) e Fromm *et al.* (*Biotechnology* 8: 833 - 839 (1990)) publicaram técnicas para a transformação da linha de milho derivada de A188 usando o bombardeio da partícula. Além disso, WO 93/07278 e Koziel *et al.* (*Biotechnology* 11:194 - 200 (1993))

5 descrevem técnicas para a transformação de linhas puras elite de milho pelo bombardeio da partícula. Esta técnica utiliza embriões de milho imaturos de comprimento de 1.5-2.5 mm extirpado de uma orelha do milho 14-15 dias após a polinização e um dispositivo de PDS-1000He Biolistics para o bombardeio.

10 A transformação do arroz pode igualmente ser empreendida pelas técnicas de transferência do gene diretas que utilizam os protoplastos ou bombardeio da partícula. Transformação mediada por protoplasto foi descrita por tipos Japônicos e Índicos (Zhang *et al.* *Plant Cell Rep* 7: 379 - 384 (1988); Shimamoto *et al.* *Nature* 338:274 - 277 (1989); Datta *et al.* *Biotechnology* 8: 736 - 740 (1990)). Ambos os tipos são igualmente rotineiramente transformáveis usando bombardeio de partícula (Christou *et al.* *Biotechnology* 9:957 - 962 (1991)). Além disso, WO 93/21335 descreve técnicas para a transformação do arroz através de eletroporação.

20 Pedido de Patente EP 0 332 581 descreve técnicas para a geração, transformação e regeneração dos protoplastos de Pooideae. Estas técnicas permitem a transformação de *Dactylis* e trigo. Além disso, a transformação do trigo foi descrita por Vasil *et al.* (*Biotechnology* 10:667 - 674 (1992)) usando o bombardeio da partícula em células de callus regeneráveis de longo termo do tipo C, e igualmente por Vasil *et al.* (*Biotechnology* 11: 25 1553-1558 (1993)) e Weeks *et al.* (*Plant Physiol.* 102:1077 - 1084 (1993)) usando o bombardeio da partícula de embriões imaturos e callus derivados de embrião imaturo. Uma técnica preferida para a transformação do trigo, entretanto, envolve a transformação do trigo pelo bombardeio da partícula de embriões imaturos e inclui uma sacarose elevada ou uma etapa elevada de 30 maltose antes da entrega do gene. Antes do bombardeio, todo o número dos embriões (0.75-1 mm de comprimento) é chapeado no meio do MS com a sacarose de 3% (Murashiga & Skoog, 15:473 - 497 (1962)) e 3 mg/l 2,4-D

para a indução de embriões somáticos, o qual é permitido prosseguir no escuro. No dia escolhido do bombardeio, os embriões são removidos do meio da indução e colocados no osmoticum (isto é, meio da indução com a sacarose ou maltose adicionada na concentração desejada, tipicamente 15%).

- 5 Os embriões são permitidos para plasmolisar durante 2-3 horas e então bombardeados. Vinte embriões por placa-alvo são típicos, embora não críticos. Um gene apropriado carregando plasmídeo (tal como, pCIB3064 ou pSOG35) é precipitado em partículas de ouro do tamanho do micrômetro usando procedimentos padrão. Cada placa dos embriões é disparada com o
- 10 dispositivo de hélio Dupont BIOLISTICS® usando uma pressão do estouro de aproximadamente 1000 psi usando uma tela padrão de 80 mesh. Após o bombardeio, os embriões são colocados de novo no escuro para recuperar por aproximadamente 24 horas (ainda no osmoticum). Após 24 horas, os embriões são removidos do osmoticum e colocados para trás no meio da
- 15 indução onde permanecem por aproximadamente um mês antes da regeneração. Aproximadamente um mês mais tarde os embriões explantes com desenvolvimento de callus embriogênico são transferidos ao meio de regeneração (MS + 1 mg/litro NAA, 5 mg/litro GA), ainda contendo o agente de seleção apropriado (10 mg/1 basta no caso de pCIB3064 e 2 mg/1 de meto-
- 20 traxato no caso de pSOG35). Após aproximadamente um mês, os tiros desenvolvidos são transferidos aos recipientes estéreis maiores conhecidos como "GA7s" que contêm o MS de meia-força, 2% de sacarose, e a mesma concentração de agente de seleção.

- Foi descrita a transformação de monocotiledônios utilizando *Agrobacterium*. Veja, WO 94/00977 e Patente U. S. Nº 5.591.616, sendo cada
- 25 uma delas aqui incorporadas por referência. Veja também, Negrotto et al. Plant Cell Reports 19: 798-803 (2000), aqui incorporados por referência. Por exemplo, o arroz (*Oryza sativa*) pode ser utilizado para a geração de plantas transgênicas

- 30 Vários cultivares de arroz podem ser utilizados (Hiei et al., 1994, Plant Journal 6:271-282; Dong et al., 1996, Molecular Breeding 2:267-276; Hiei et al., 1997, Plant Molecular Biology, 35: 205-218). Além disso, os com-

ponentes de diversos meios descritos abaixo podem variar em quantidade ou serem substituídos. As respostas embriogênicas são iniciadas e/ou culturas são estabelecidas a partir de embriões maduros por cultura em meio MS-CIM (sais MS basal, 4,3 g/litro; vitaminas B5 (200X), 5 ml/litro, sacarose, 30 g/litro; prolina, 500 mg/litro; glutamina, 500 mg/litro; hidrolisado de caseína, 300 mg/litro, 2,4-D (1 mg/ml), 2 ml/litro; ajustar o pH para 5,8 com 1 N KOH; Fitigel, 3 g/litro).

Os embriões maduros nas fases iniciais da resposta da cultura ou linhas de cultura estabelecida são inoculados e cocultivados com *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (*Agrobacterium*) contendo a construção do vetor desejado. O *Agrobacterium* é cultivado a partir de estoques de glicerol em meio sólido YPC (100 mg/L espectinomicina e qualquer outro antibiótico adequado) por cerca de 2 dias a 28°C. O *Agrobacterium* é novamente suspenso em meio líquido MS -CIM. A cultura de *Agrobacterium* é diluída em OD600 de 0,2-0,3 e a acetoseringona é adicionada a uma concentração final de 200 µM. A acetoseringona é adicionado antes da mistura na solução com as culturas de arroz para induzir o *Agrobacterium* para transferir DNA para as células vegetais.

Para a inoculação, as culturas de plantas são imersas na suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana líquida é retirada e as culturas inoculadas são colocadas em meio de cocultivo e incubadas a 22°C por dois dias. As culturas são então transferidas para meio MS-CIM com Ticarcilina (400 mg/litro) para inibir o crescimento de *Agrobacterium*. Para os construtos utilizando o gene marcador de seleção PMI(Reed et al. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37: 127-132), as culturas são transferidas para o meio de seleção contendo manose como uma fonte de carboidrato (MS com 2% de manose, 300 mg/litros Ticarcilina), após 7 dias, e cultivadas por 3-4 semanas no escuro. Colônias resistentes são então transferidas para meio de indução de regeneração (MS sem 2,4-D, 0,5 mg/litro IAA, 1 mg/litro zeatina, 200 mg/litro TIMENTIN Manose 2% e 3% de sorbitol) e cultivadas no escuro por 14 dias. As colônias de proliferação são então transferidas para outro meio de indução de regeneração e movidas para a sala de crescimento de luz.

Brotos são transferidos para recipientes GA7 com GA7-1 suporte (MS sem hormônios e 2% sorbitol) por duas semanas e depois são transferidos para a estufa quando estão grandes o suficiente e têm raízes adequadas. As plantas são transplantadas para o solo na estufa (para produção)

5 crescidas até o amadurecimento e a semente de Ti é colhida. Para a transformação de plastídeos, sementes de *Nicotiana tabacum* cv "Xanthienc" são germinadas sete por placa de 1 "matriz circular em meio ágar T e bombardeado 12-14 dias após a semeadura com 1 um partículas de tungstênio (MLO, Biorad, Hercules, Calif .) revestidas com DNA de plasmídeos pPH143

10 e pPH145 essencialmente como descrito (Svab, Z. e Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913-917). As mudas bombardeadas são incubadas em T médio por dois dias depois que as folhas são cortadas e colocadas de lado em luz brilhante (350-500 photons/m²/s umol) em placas de meio de RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. e Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526-8530) contendo 500 ug/ml

15 de dicloridrato espectinomicina (Sigma, St. Louis, Mo.). Brotos resistentes que aparecem debaixo das folhas branqueadas de três a oito semanas após o bombardeamento são subclonadas para o mesmo meio seletivo, poderão formar caules e brotações secundárias isoladas e subclonadas. A segregação completa de cópias de genomas de plastídios transformadas (homoplasmicidade) em subclones independentes é avaliada através de técnicas

20 padrão de Southern blotting (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). BamHI/EcoRI-digerida total do ADN celular (Mettler, I. J. (1987) Plant Mol BiolReporter 5, 346349) é separado em 1% Tris-borato (TBE) géis de agarose, transferidos para membranas de nylon (Amersham) e experimentada

25 com. Sup.32P-rotulada aleatoriamente com sequências de correspondentes a um BamHI 0,7 kb/HindIII fragmento de DNA de PC8 Brotos homoplásmico estão enraizadas em condições assépticas espectinomicina-MS contendo/IBA médio (McBride, KE et al. (1994) PNAS 91, 7301-7305) e transferido

30 para a estufa.

As plantas obtidas através de transformação, com uma sequência de ácido nucleico da presente invenção pode ser qualquer um de uma

grande variedade de espécies vegetais, incluindo os de monocotiledôneas e dicotiledôneas, entretanto, as plantas usadas no método da invenção são preferivelmente selecionado a partir da lista de culturas agronomicamente-alvo de importantes safras estabelecidas acima. A expressão de um gene da presente invenção em combinação com outras características importantes para a produção e qualidade pode ser incorporada às linhas de plantas por meio de reprodução. Breeding abordagens e técnicas são conhecidas na técnica. Veja, por exemplo, o galês JR, *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley & Sons, NY (1981); *Crop Breeding*, Wood D. R. (Ed.) Sociedade Americana de Agronomia Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Second Edition, Clarendon Press, Oxford (1987), Singh, PD, *melhoramento para resistência a doenças e pragas de insetos*, Springer-Verlag, NY (1986) e Wricke e Weber, *Genética Quantitativa e Melhoramento de Plantas Seleção*, Walter de Gruyter and Co., Berlim (1986).

As propriedades de engenharia genética nas sementes transgênicas e plantas descritas acima são transmitidas pela reprodução sexual ou crescimento vegetativo e pode, portanto, ser mantida e propagada nas plantas descendentes. Geralmente, a manutenção e a propagação fazem uso de métodos agrícolas conhecidos desenvolvidos para atender fins específicos, tais como cultivar, semear ou colher.

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

EXPERIMENTAL

Exemplo 1:

Produção de glicose utilizando amilase e glicoamilase expressando as plantas.

Dois tipos diferentes de milho foram moídos para uma farinha e misturados em proporções definidas. O primeiro tipo foi o 797GL3 milho amilase (isto é, "Corn Amylase" [amilase de milho], ou "CA"; descrito na U.S. Patente N° 2006/0230473, arquivado em 12 de outubro, 2006, nesta incorporada por referência). O segundo milho foi o incorporado que expressa o *Thermomyces lanuginosus* enzima glucoamilase (isto é, "TIGA"). Este milho

foi transformado com a construção pNOV12493, que tem o gamma-zein condução promotora do gene *tlga*. A enzima foi orientada para o apoplasto das células do endosperma.

As farinhas de milho transgênico foram misturadas em diferentes proporções (19: 1, 9: 1, 5: 1, 4: 1 e 1: 1; T1GA: CA, w/w) em água, incubados em diferentes temperaturas (30 - 90°C) para diferentes tempos (1h - 72h), e em diferentes níveis de sólidos (1%, 10% e 25% de sólidos totais, w/v). O saldo de sólidos na mistura composta de farinha de milho amarela Dent. Os resultados foram comparados com uma composição de 100% de farinha de milho amarela Dent. A produção de glicose foi medida e usada para calcular a percentagem de amido hidrolisado. A figura 2 demonstra a sinergia entre a glicoamilase (TIGA) e amilase (íngremes) para a produção de glicose.

Exemplo 2:

15 Otimização de GA e Mistura CA

O trabalho adicional (não é mostrado) foi feito para melhorar as condições para maximizar a conversão do amido em glicose. A temperatura ótima para este ensaio foi de 65 - 70°C.

A mistura ótima foi de 4: 1 (80% do milho e 20% *tlga* milho amilase), em uma mistura de 10% de sólidos (10% TIGA/mistura CA, milho dentado 90% amarelo). Incubando a mistura por 1-3 dias, superior a 90% do amido é convertido em glicose e pequenos açúcares solúveis (figura 3). Existe uma dependência da temperatura para o equilíbrio entre a glicose e pequenos açúcares solúveis.

25 Incubando uma mistura de 80% dos *Thermomcyces lanuginosus* glicoamilase expressando farinha de milho com 20% de 797GL3-amilase expressa farinha de milho em 65-70°C, fomos capazes de degradar > 90% do amido em glicose e outros açúcares solúveis.

30 Dado que este processo estava olhando para um "um" pote de amido para a conversão de glicose, que não foi melhorado para a Amilase processo de etanol de milho modificado convencional. Ao fazer isso, espera-se que, mesmo mais do amido pode ser hidrolisado. Além disso, essas mis-

turas são específicas para os eventos TLGA que foram testados e podem ser usados como um modelo para melhorar misturas para aplicações específicas, usando outro traço contendo culturas.

Esta combinação de amilase e glicoamilase expressas no milho mostram a capacidade de digerir o amido em açúcares fermentáveis, portanto, ele deve funcionar bem em um processo de fermentação do etanol. Além disso, um saco de mistura de dois eventos de milho que contém enzimas tem a capacidade de entregar a mistura correta de material vegetal colhido para a instalação de produção de etanol.

10 Exemplo 3:

Pré-plantio determinação da atividade da amilase e glicoamilase em misturas de grão colhido:

A atividade de amilase em grão colhido pode ser determinada a partir do potencial de rendimento de variedades de milho que compõem a
 15 mescla de sementes, o nível de expressão do traço na variedade de milho, e o proporção de que as variedades de milho são misturadas com a mistura de sementes. O potencial de rendimento (Y) em unidade de peso por unidade de superfície [por exemplo, bushels por acre (bu/ac)] para as variedades de milho expressando característica pode ser determinado por métodos bem
 20 descrito no artigo. O nível de expressão da enzima em plantas (X) na unidade de atividade por unidade de massa [por exemplo, unidades de atividade por bushel (U/bu)] pode ser determinado por métodos de análises quantitativas descritas a seguir. As percentagens (Z) da semente de milho do traço expressando variedade de milho e de sementes de variedades de milho não-
 25 característica são determinadas por pesagem, ambas as variedades anteriores à mistura de sementes. A atividade da amilase [E (A)] em grão colhido nas unidades de atividade por unidade de massa (por exemplo, U/bushel) pode ser calculada pela equação abaixo:

$$\text{Equação 1: } E(A) = (XA \times ZA \times YA) / [(ZA \times YA) + (Z0 \times Y0)]$$

30 Onde:

E (A) é o nível de atividade de amilase em grãos colhidos

XA é o nível de expressão de amilase em grãos

YA é o potencial de rendimento da amilase expressando a variedade do milho

ZA é o percentual de traço expressando a variedade do milho

Yo é o potencial de rendimento da variedade não-característica do milho

- 5 Zo é o percentual de variedade não-característica do milho

A atividade da amilase E (A) e glicoamilase atividade E (G) em grão colhido decorrentes de uma semente Admix amilase e glicoamilase em unidades de atividade por unidade de massa (U/bushel) pode ser calculada pela equação 2A (amilase) e 2B (glicoamilase) abaixo:

- 10 Equação 2A: $E(A) = \{(XA \times ZA \times YA) / [(ZA \times YA) + (ZG \times YG) + (ZO \times YO)]\}$

Equação 2 B: $E(G) = \{(XG \times ZG \times YG) / [(ZA \times YA) + (ZG \times YG) + (ZO \times YO)]\}$

Onde:

E (A) é o nível de atividade de amilase em grãos colhidos E (G) é o nível de atividade da glicoamilase em grão colhido

- 15 XA é o nível de expressão de amilase em grãos

Ya é o potencial de produção da amilase expressando variedade de milho

Za é o percentual de amilase expressando variedade de milho

XG é o nível de expressão da glicoamilase,

- 20 YG grão é o potencial de rendimento da glicoamilase expressando variedade de milho

ZQ é o percentual da variedade de milho expressando glicoamilase

Yo é o potencial produtivo da variedade de milho não-característica

ZQ é o percentual da variedade não-característica do milho

Exemplo 11:

- 25 Mistura de Saco de Fitase de Milho

Grão de milho expressando fitase derivado de híbrido de fitase homozigoto foi misturado com grão de milho convencional a variadas razões (5%, 10%, 15%, 25% ou 100% de milho fitase) e plantado em quatro diferentes locais geográficos. O grão foi colhido e aliqotado em um total de 16 amostras de 1 kg (4 conjuntos de amostras de cada um dos 4 locais). Para análise de atividade de fitase, uma subamostra de 100 gramas de cada amostra de 1 kg foi preparada para análise moendo 100 g em um moinho Perten

- 30

Hammer usando uma peneira 0.8mm. As amostras foram pesadas em triplicata para extração e ensaiadas em triplicata usando o método descrito na Publicação de Pedido Internacional de Patente WO 2007/002192. Os resultados são apresentados na tabela 1 abaixo.

5 Tabela 1:

Resultados de ensaio de atividade. A unidade fitase média (FTU)/g é a média de três extrações diferentes.

MATID	Local	Mistura	FTU/g médio	Extração triplicata (FTU/g)	Extração triplicata %CV	% de fitase homozigoto na amostra
06KD000060	8409	100% fitase homozigoto	1157,8	18,8	1157,8	100,0%
07KD000000	8409	5% mistura	67,0	5,7	67,0	5,8%
07KD000001	8409	15% mistura	75,4	6,4	75,4	6,5%
07KD000002	8409	25% mistura	306,9	3,8	306,9	26,5%
06KD000066	7630	100% fitase homozigoto	1347,9	29,1	1347,9	100,0%
07KD000003	7630	5% mistura	43,7	1,6	43,7	3,2%
07KD000004	7630	15% mistura	196,8	1,9	196,8	14,6%
07KD000005	7630	25% mistura	403,9	3,8	403,9	30,0%
06KD000071	761N	100% fitase homozigoto	1249,7	2,4	1249,7	100,0%
07KD000006	761N	5% mistura	10,3	0,0	10,3	0,8%
07KD000007	761N	15% mistura	127,6	1,2	127,6	10,2%
07KD000008	761N	25% mistura	247,6	5,0	247,6	19,8%
06KD000077	7334	100% fitase homozigoto	1450,3	17,6	1450,3	100,0%
07KD000009	7334	5% mistura	35,0	1,8	35,0	2,4%
07KD000010	7334	15% mistura	151,3	5,5	151,3	10,4%
07KD000011	7334	25% mistura	422,5	3,8	422,5	29,1%

Exemplo 12:

10 Amostras para Mistura de Saco de Amilase de Milho

Sementes de 4 diferentes híbridos expressando Amilase de Milho (CA) hemizigotos foram misturadas com sementes negativas isogênicas de cada híbrido a razões variadas (5%, 15%, 25% ou 100% de sementes de Amilase de Milho) e plantadas em cinco locais geográficos diferentes. O milho nos terrenos foi deixado abrir polinizado e 20 espigas foram colhidas do centro do terreno para cada local e cada híbrido para fazer uma amostra compósita de aproximadamente 1 kg. Para análise de da atividade alfa-amilase, uma subamostra de 250 gramas de cada amostra de 1 kg foi moída usando um Moinho de Disco Perten Laboratory 3600 no ajuste 0. Milho de commodity NK N58-D1 foi moído usando o mesmo moinho no mesmo ajuste

para usar como um controle negativo. O teor de umidade da farinha foi tomado usando aproximadamente 0.75 g de farinha no Analisador de Umidade de Halogênio Mettler Toledo HB43 a 130°C. O teor de umidade foi usado para calcular peso seco usando a fórmula:

$$5 \quad (\text{Peso molhado}) = (\text{peso seco}) / (1 - (\% \text{ de umidade na farinha} / 100))$$

Curva-padrão para Prever a Razão de Mistura:

Farinha de grão 100% CA foi usada para fazer misturas a níveis de 0, 1,0, 2,5, 5, 10, 15 e 20% CA para construir uma curva-padrão usando um ensaio viscométrico. Para fazer 75 g de cada mistura, alíquotas apropriadas de farinha 100% CA foram misturadas com farinha de milho de commodity N58-D1 com base no peso seco das farinhas. A atividade alfa-amilase foi determinada medindo a atividade de redução de viscosidade destas misturas de Amilase de Milho no substrato de amido. A viscosidade foi medida usando um visco-analisador RVA (Newport Scientific). Para ajustar as reações, o teor de umidade do substrato de amido (grau Alimentício de supermercados) foi primeiro determinado usando o método descrito acima. Um recipiente de viscosímetro foi colocado, então, em uma balança e a balança foi calibrada a zero. 2,7 g de peso seco de amido foi adicionado ao recipiente do viscosímetro. 0,3 g de peso seco de cada uma das misturas CA foi pesado em uma balança analítica separada e, então, acrescentado ao recipiente do viscosímetro. Tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5 foi acrescentado, então, ao recipiente para trazer o conteúdo total do recipiente a 30,00 g. O conteúdo do recipiente foi misturado, então, completamente de forma que a mistura fosse homogênea e nenhuma aglomeração estivesse presente no recipiente. Uma pá de viscosímetro foi inserida, então, dentro de um visco-analisador RVA-4 preaquecido rapidamente para começar a análise. A tabela 2 mostra o método de análise usado no RVA-4.

Tabela 2:

Parâmetros de análise de viscosidade RVA-4

Tempo	Tipo de mudanças	Valores
00:00:00	Temperatura	50°C
00:00:00	Velocidade	960 rpm

Tempo	Tipo de mudanças	Valores
00:00:10	Velocidade	160 rpm
00:01:00	Temperatura	50°C
00:06:00	Temperatura	90°C
00:08:00	Temperatura	90°C
00:10:00	Temperatura	50°C
Tempo entre leituras: 4 segundos		

As leituras de viscosidade foram registradas a 7.2 minutos para cada mistura na curva-padrão estabelecida (0, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0% CA) em triplicata e analisadas usando pacote de software JMP (SAS Institute). As leituras de viscosidade foram log-transformadas (base 10) e um modelo de regressão de quadrados mínimos foi usado para gerar as curvas padrão e declives estimados e intercepções y. Para todas as amostras, gráficos dos dados indicaram uma relação linear entre viscosidade e dose de amilase de milho. Os declives e intercepções y foram todos significativos ($p < 0,001$) e foram usados para gerar a equação seguinte:

$$\log_{10} (\text{Viscosidade}) = \text{intercepção } y - \text{declive} * (\text{Dose})$$

Medição de Viscosidade de Amostras de Mistura de Saco:

A viscosidade da farinha de misturas de saco colhidas de 5% e 15% CA foi medida em triplicata usando o mesmo método. A curva-padrão descrita acima indicou que a viscosidade plotada contra a razão de mistura era linear de 0% CA a 20% CA. Nenhuma atividade foi detectada no controle negativo.

Para farinha de misturas de saco colhidas de 25% CA, as amostras foram diluídas primeiro misturando-as com quantidades iguais de farinha de milho de commodity N58-D1 para alcançar o nível de CA de aproximadamente 12,5% a fim de ficar dentro da faixa linear da curva-padrão. A viscosidade das amostras foi, então, medida em RVA-4 em triplicata. A razão de mistura de Amilase de Milho no grão foi, então, calculada usando as curvas padrão com base na fórmula seguinte:

$$\text{Dose de CA (\%)} = (\log_{10} (\text{Viscosidade Média Observada}) - \text{Intercepção } Y) / \text{Declive}$$

Amostras de mistura de saco colhidas foram coletadas de cada local como descrito no título "Amostras para mistura de saco de Amilase de Milho". O nível de mistura previsto para cada híbrido em cada local foi determinado como descrito acima. Havia variação considerável dos níveis de mistura previstos ao comparar o mesmo híbrido através de vários locais. Além disso, havia variação considerável entre híbridos quando foram comparados híbridos no mesmo local. Dados para todos os híbridos em todos os locais foram combinados juntos e demonstraram que o nível de mistura pode ser previsto com base na técnica descrita acima para produzir a mistura de saco e são mostrados na tabela 3.

Tabela 3:

Níveis de mistura de grão de Amilase de Milho medidos usando o ensaio viscométrico

Mistura de CA em semente (%)	Mistura de CA em grão (%)
5	8,1
15	18,7
25	28,2

Exemplo 13: Amostras para glucoamilase *Thermomyces lanuginosus* e mistura de saco de Amilase de Milho

Sementes de um híbrido de milho expressando *Thermomyces lanuginosus* glucoamilase (TIGA) hemizigoto homogêneo e um híbrido de milho expressando Amilase de Milho (CA) hemizigoto homogêneo foram misturadas à razão de 80% TIGA:20% CA para constituir a entrada de controle. Estas sementes misturadas ainda foram misturadas com sementes híbridas de milho negativas isogênicas que formaram a entrada de teste de mistura de saco na razão de 90% Negativo: 10% (80% TIGA:20% CA). Ambas as entradas de controle e teste foram plantadas em um local geográfico. A entrada de controle (80% TIGA:20% CA) foi autopolinizada. Todas as espigas da entrada de controle foram colhidas por filas (20 filas no total) para gerar 20 amostras. Alíquotas de grão de 150 g foram tomadas de cada amostra e 10 amostras fortuitas foram misturadas para fazer duas amostras compostas (Batelada 1 e Batelada 2). A entrada de teste (90% Negati-

vo:10% (80% TIGA:20% CA)) foi plantada como uma única unidade contendo 32 filas de largura e 6 blocos de filas de 15 pés e foi abrir polinização para simular misturação natural de pólen transgênico e não transgênico. As filas do centro (15 filas no total) do bloco de centro da entrada de teste foram colhidas para gerar 15 amostras. Do grão produzido na entrada de teste, foram levadas alíquotas de 150g de cada amostra e 7 e 8 amostras fortuitas foram misturadas para fazer duas amostras compostas (Batelada 1 e Batelada 2). Todas as quatro amostras compostas e o milho de commodity NK N58-D1 foram moídos usando um Moinho de Disco Perten Laboratory 3600 no ajuste 0. O conteúdo de umidade foi tomado usando aproximadamente 0.75 g de farinha no Analisador de Umidade de Halogênio Mettler Toledo HB43 a 130°C. O conteúdo de umidade foi usado para calcular peso seco usando a fórmula:

$$(\text{Peso molhado}) = (\text{peso seco}) / (1 - (\% \text{ de umidade de farinha} / 100))$$

15 Curva-padrão para Prever a Razão de Mistura de CA:

Farinha do milho de controle (80% TIGA:20% CA) foi usada para fazer misturas a níveis de 0, 1,0, 2,5, 5, 10, 15 e 20% CA para construir uma curva-padrão usando um ensaio viscométrico. Para fazer 75 g de cada mistura, alíquotas apropriadas de farinha de milho de controle foram misturadas com farinha de milho de commodity N58-D1 com base no peso seco das farinhas. A atividade alfa-amilase foi determinada medindo a atividade de redução de viscosidade destas misturas de Amilase de Milho no substrato de amido. Deve ser notado que TIGA nas farinhas seria inativado durante o ensaio de viscosidade e daí não teve nenhum impacto na redução de viscosidade do substrato de amido (dados Experimentais não-mostrados). A viscosidade foi medida usando um visco-analisador RVA -4 (Newport Scientific). Para ajustar as reações, o conteúdo de umidade do substrato de amido (grau Alimentício de supermercados) foi primeiro determinado usando o método descrito acima. Um recipiente de viscosímetro foi colocado, então, em uma balança e a balança foi calibrada a zero. 2,7 g de peso seco de amido foram adicionados ao recipiente do viscosímetro. 0,3 g de peso seco de cada uma das misturas de CA foi pesado em uma balança analítica separada

e, então, acrescentado ao recipiente do viscosímetro. Tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5 foi acrescentado, então, ao recipiente para trazer o conteúdo total do recipiente a 30,00 g. O conteúdo do recipiente foi misturado, então, completamente de forma que a mistura fosse homogênea e nenhuma aglomeração estivesse presente no recipiente. Uma pá de viscosímetro foi inserida, então, dentro do recipiente e o recipiente foi colocado dentro de um visco-analisador RVA-4 preaquecido rapidamente para começar a análise. O método de análise usado no RVA-4 está mostrado na tabela 2 acima.

As leituras de viscosidade foram registradas a 7,2 minutos para cada mistura na curva-padrão estabelecida (0, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0% CA) em triplicata e analisadas usando pacote de software JMP (SAS Institute). As leituras de viscosidade foram log-transformadas (base 10) e um modelo de regressão de quadrados mínimos foi usado para gerar as curvas padrão e declives estimados e intercepções y. Para ambas as amostras de controle (Batelada 1 e Batelada 2) gráficos dos dados indicaram uma relação linear entre viscosidade e dose de amilase de milho. Os declives e intercepções y foram todos significativos ($p < 0,001$) e foram usados para gerar a equação seguinte:

$$\text{Log}_{10} (\text{Viscosidade}) = \text{intercepção } y - \text{declive} * (\text{Dose})$$

A curva-padrão descrita acima indicou que a viscosidade plotada contra a razão de mistura foi linear de 0% CA a 20% CA. Nenhuma atividade foi detectada no controle negativo.

Medição de Razões de Mistura de CA de Amostras de Mistura de Saco:

A viscosidade das duas bateladas de farinhas do milho de teste colhido (90% Negativo:10% (80% TIGA:20%CA)) foi medida em triplicata usando o mesmo método. A razão de mistura de Amilase de Milho no milho de teste foi, então, calculada usando as curvas padrão com base na fórmula seguinte:

$$\text{Dose de CA (\%)} = (\log_{10} (\text{Viscosidade Observada Média}) - \text{Intercepção } Y) / \text{Declive}$$

Os resultados mostrados na tabela 4 demonstraram que o nível de mistura de CA pode ser previsto com base na técnica descrita acima para

produzir a mistura de saco. A porcentagem na coluna 4 é representativa da enzima transgênica total na mistura (CA e TIGA).

Tabela 4:

Níveis de mistura de grão de Amilase de Milho medidos usando ensaio viscométrico

Mistura de semente	Batelada	Mistura de CA grão (%)	Mistura de CA grão média (%)
90% Negativo:10% (80% TIGA:20% CA)	1	7,6	8,2
90% Negativo:10% (80% TIGA:20% CA)	2	8,7	

Medição de razões de Mistura TIGA de Amostras de Mistura de Saco:

Amostras de mistura de saco colhidas foram reunidas e preparadas como descrito no título "Amostras para glucoamilase *Thermomyces lanuginosus* e mistura de saco de Amilase de Milho". Aproximadamente 3 g de cada uma das quatro amostras de farinha (milho de controle e milho de teste) em triplicata foram pesados em tubos de centrífuga cônicos de 50 ml. 40 ml de solução de EDTA 1 mM foram acrescentados a cada tubo. Um rotador foi usado para misturar os tubos através de inversão durante uma hora a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados, então, a 1500 x g durante 15 min a 4°C. Uma porção do sobrenadante que foi denominada um extrato foi, então, removida para ensaio.

A atividade de glucoamilase em farinha de milho foi determinada medindo a quantidade de glicose produzida em uma hora do substrato de amido solúvel a pH 5,5 e 50°C. O tampão de ensaio era tampão McIlvanes pH 5.5 modificado por adição de EDTA a uma concentração final de 1mM. O EDTA foi incluído na extração e no tampão de ensaio para inibir qualquer alfa-amylase que foi extraída e assim impedir a mesma de interferir com o ensaio. O substrato é amido solúvel a 2% (p/v) em EDTA 1 mM.

Extratos foram diluídos em série em tampão de ensaio antes do ensaio. As diluições eram de 3,5 vezes, 12,25 vezes e 42,88 vezes. Cada extrato foi ensaiado em triplicata.

O substrato foi aliquotado (50 μ l/poço) em placas PCR de 96 poços que foram mantidos em gelo. O extrato diluído (50 μ l/poço) foi somado, então, e misturado no substrato. As placas foram seladas, então transferidas a termociclones preesfriados. Uma placa (a placa 0 min.) foi aquecida de 1°C a 95°C na taxa máxima (aproximadamente 1 min foi requerido), mantida a 95°C durante 10 min então esfriadas até 1°C à taxa máxima. TIGA perde atividade rapidamente acima de 70°C, assim a etapa de 95°C inativa a enzima e pára a reação. A outra placa (a placa de 60 min.) foi aquecida de 1°C a 50°C a taxa máxima e mantida a 50°C durante 60 min. A reação foi parada escalonando a temperatura para 95°C e mantida a 95°C durante 10 min, então, esfriada até 1°C à taxa máxima.

A glicose gerada nas reações acima foi determinada usando reagente de ensaio de glicose comprado de Megazyme (Catálogo #: K-Gluc) e preparado seguindo as instruções do vendedor. 10 μ l do conteúdo de cada poço das duas placas PCR de reação TIGA descritas acima foram transferidos para novas placas de microtitulação de 96 poços. Padrões de glicose (0 a 2 mg/ml) também foram pipetados (10 μ l/poço) em duplicata nas placas novas para gerar uma curva-padrão de glicose. Reagente de ensaio de glicose (200 μ l/poço) foi somado com misturação. As placas de microtitulação foram incubadas a 40°C por 20 min e a absorvância a 510 nm foi então medida. O conteúdo de glicose das reações foi determinado através de referência a curva-padrão. A atividade do controle negativo foi desprezível.

Uma unidade de atividade de GA foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μ mol de glicose por min no ensaio. Resultados dos ensaios que caíram dentro da faixa linear do ensaio (0.5-10 mU por ensaio) foram mediados.

Os resultados mostrados na tabela 5 demonstraram que o nível de mistura de TIGA no teste pode ser previsto com base na técnica descrita acima para produzir a mistura de saco. A porcentagem na coluna 5 é representativa da enzima transgênica total na mistura (CA e TIGA).

Tabela 5:

Níveis de mistura de grão TIGA medidos usando ensaio de glicose colorimé-

trico

Mistura de se- mente	Batelada	Atividade TIGA de grão média (U/g)	Atividade média entre bateladas (U/g)	Mistura TIGA de grão mé- dia (%)
80% TIGA:20% CA	1	29,0	32,4	100
80% TIGA:20% CA	2	35,8		
90% Negati- vo:10% (80% TIGA:20% CA)	1	2,4	2,2	6,7
90% Negati- vo:10% (80% TIGA:20% CA)	2	2,0		

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados no relatório são indicativos do nível de habilidade daqueles qualificados na técnica a qual esta invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de pa-
5 tente estão neste incorporados para referência no mesmo grau se cada publicação individual ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado para referência.

Embora a invenção precedente tenha sido descrita em algum detalhe por meio de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de en-
10 tendimento será óbvio que certas mudanças e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de safra com um nível predeterminado de pelo menos uma característica primária de interesse em tal safra, tal método é caracterizado pelo fato de compreender:

5 a) obtenção de uma mistura de pelo menos uma primeira e uma segunda variedade de sementes, onde tal mistura compreende uma porcentagem de pelo menos uma variedade de semente que produzirá uma planta apresentando tal característica primária;

b) plantio de tal mistura de sementes; e,

10 c) colheita de tal safra, onde tal safra compreende tal nível predeterminado de pelo menos uma característica primária,

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tal mistura ocorre no momento do plantio de tais sementes.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
15 fato de que tal característica primária de interesse é selecionada a partir de uma enzima, nutriente, hormônio, toxina, marcador selecionável e uma cor de revestimento de semente.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tal enzima é celulase.

20 5. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tal enzima é fitase.

6. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tal enzima é amilase.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo
25 fato de que tal enzima é glucoamilase.

8. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tal enzima é glucanase.

9. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tal toxina é toxina *Bacillus thuringiensis*.

30 10. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tal enzima é xilanase.

11. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo

fato de que tal safra fornece nutrientes úteis para a alimentação de animais.

12. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que tal característica é útil no bioprocessamento.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que tal característica é útil para a produção de álcool industrial.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tal safra é útil para a alimentação humana.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a porcentagem da variedade da semente que produzirá tal característica primária está entre 0,1% e 99,9% da mistura total.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda pelo menos uma terceira variedade de sementes na mistura que está entre 0,1% e 99,8%, onde a soma de cada variedade de semente na mistura é igual a 100%.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que tal terceira variedade de semente apresenta a mesma característica primária de interesse como em pelo menos uma das variedades de semente na mistura.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tal primeira variedade de semente é distinta de pelo menos uma segunda variedade de semente.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que tal primeira variedade de semente é distinta da segunda variedade de semente por ter uma cor de revestimento de semente diferente.

20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que tal primeira variedade de semente é distinta da segunda variedade de semente por ter um tratamento de semente diferente.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tal primeira variedade de semente produz uma planta que apresenta uma primeira característica de interesse e a segunda variedade de semente produz uma planta que apresenta uma segunda característica primária de interesse.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tal safra é obtida de uma planta selecionada do grupo que consiste de arroz, cevada, batata, batata doce, canola, girassol, centeio, aveia, trigo, milho, soja, beterraba, tabaco, erva *Miscanthus*, capim, cártamo, árvores, algodão, mandioca, tomate, sorgo, alfafa e cana de açúcar.

23. Mistura de sementes pré-embaladas, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma primeira e uma segunda variedade de sementes, onde pelo menos a primeira variedade de sementes produz uma planta com uma característica primária de interesse, onde a percentagem da primeira variedade de sementes é inferior a 100% de tal mistura e suficiente para produzir um nível predeterminado de tal característica primária em uma safra coletada a partir de um campo plantado com a mesma mistura.

24. Mistura, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que tal característica é selecionada a partir de uma enzima, nutriente, hormônio, toxina, marcador selecionável e uma cor de revestimento de semente.

25. Mistura, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que tal enzima é celulase.

26. Mistura, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que tal enzima é fitase.

27. Mistura de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que tal enzima é amilase.

28. Mistura de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que tal enzima é glucoamilase.

29. Mistura de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que tal enzima é glucanase.

30. Mistura de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que tal enzima é xilanase.

31. Mistura de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que tal toxina é toxina *Bacillus thuringiensis*.

32. Mistura de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que tal safra fornece nutrientes úteis para a alimentação de animais.

33. Mistura de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que tal característica é útil no bioprocessamento.

34. Mistura de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que tal característica é útil para a produção de álcool industrial.

5 35. Mistura de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que tal safra é útil para a alimentação humana.

36. Mistura de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que a porcentagem da variedade da semente que produzirá tal característica primária está entre 0,1% e 99,9%.

10 37. Mistura de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de compreender ainda pelo menos uma terceira variedade de sementes na mistura que está entre 0,1% e 99,8%, onde a soma de cada variedade de semente na mistura é igual a 100%.

15 38. Mistura de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que tal primeira variedade de semente é distinta de pelo menos uma segunda variedade de semente.

39. Mistura de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que tal primeira variedade de semente é distinta da segunda variedade de semente por ter uma cor de revestimento de semente diferente.

20 40. Mistura de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de que tal primeira variedade de semente é distinta da segunda variedade de semente por ter um tratamento de semente diferente.

25 41. Mistura de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que tal primeira variedade de semente produz uma planta que apresenta uma primeira característica e a segunda variedade de semente produz uma planta que apresenta uma segunda característica.

30 42. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que tal safra é selecionada a partir do grupo que consiste em arroz, cevada, batata, batata doce, canola, girassol, centeio, aveia, trigo, milho, soja, beterraba, tabaco, erva Miscanthus, capim, cártamo, árvores, algodão, mandioca, tomate, sorgo, alfafa e cana de açúcar.

43. Método para obtenção de colheita com um nível predetermi-

nado de pelo menos uma característica primária de interesse em tal safra, tal método é caracterizado pelo fato de compreender:

- a) obtenção de pelo menos uma primeira e uma segunda variedade de sementes, onde pelo menos uma variedade de sementes produz
5 uma planta que apresenta a característica primária de interesse;
- b) plantio de tal semente;
- c) colheita de tal material da planta produzida de cada variedade de semente; e,
- d) combinação de um material de planta colhida em uma relação-alvo, onde a combinação de tal relação-alvo resulta em uma safra com
10 um nível predeterminado de pelo menos uma característica primária.

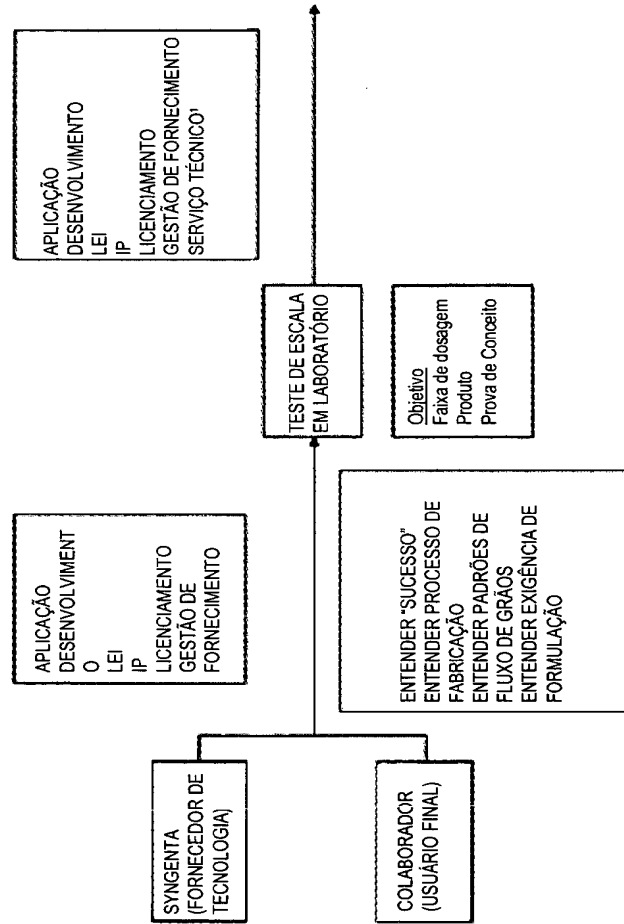


FIG. 1A

A FUNÇÃO É PRIMORDIALMENTE UMA CAPACIDADE CONSULTIVA NESTA ETAPA. ISSO TERÁ UM PAPEL IMPORTANTE NA FASE POSTERIOR DO PROJETO.

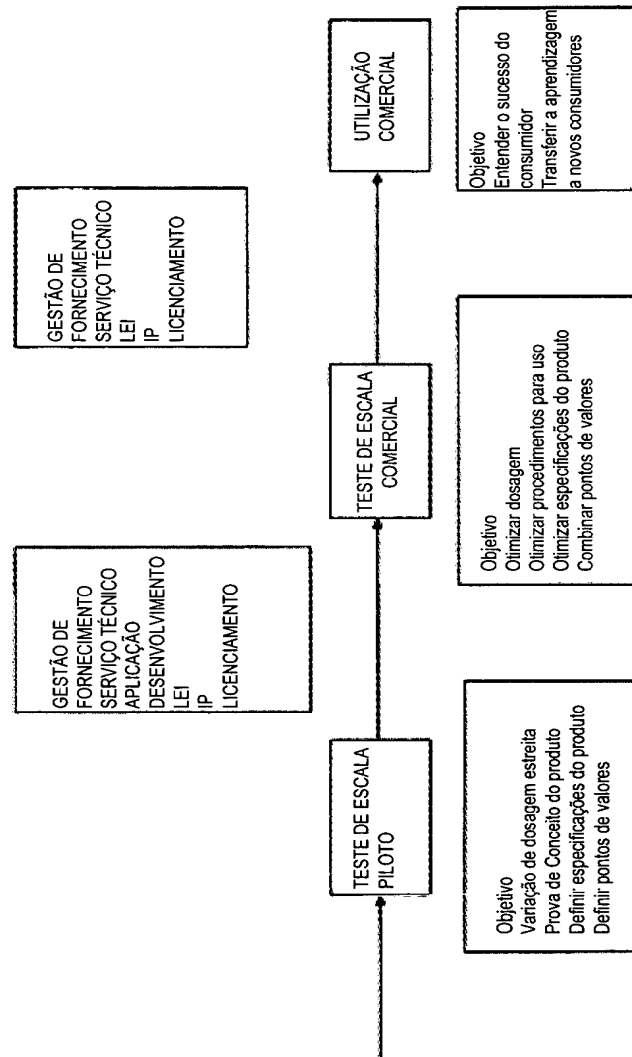


FIG. 1B

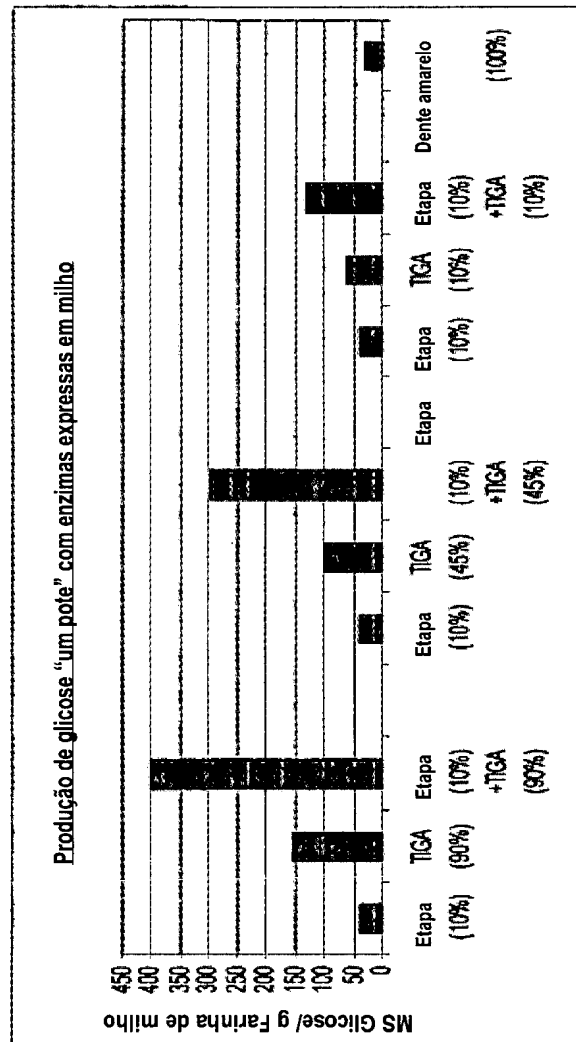


FIG. 2

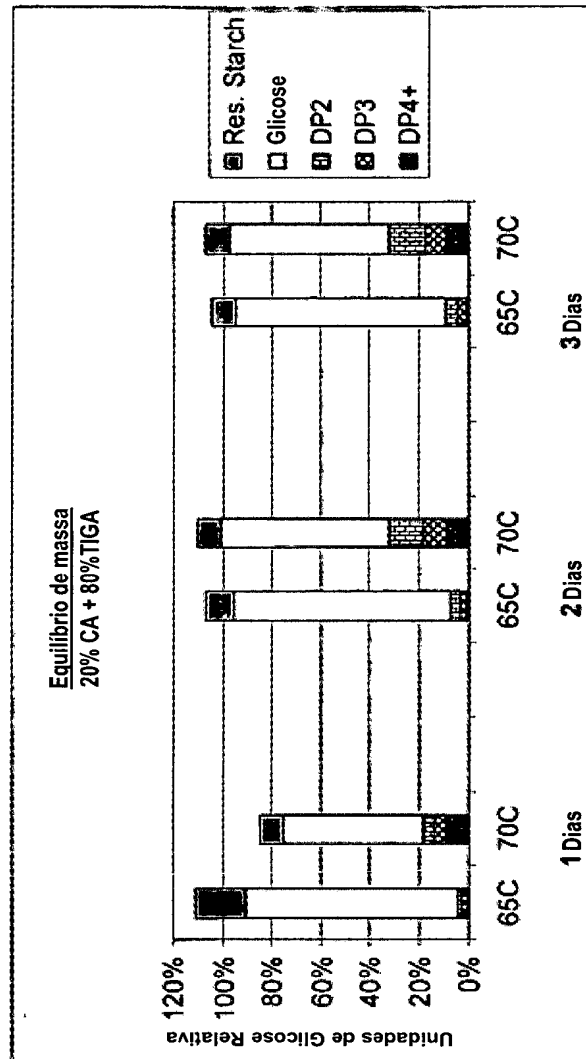


FIG. 3

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE SAFRA, MISTURA DE SEMENTES PRÉ-EMBALADAS, MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE SAFRA E MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE LICENCIAMENTO"**.

A presente invenção refere-se a composições e métodos para a produção de safra com um nível predeterminado de pelo menos uma característica primária de interesse. As composições compreendem sementes e plantas que apresentam uma característica primária de interesse. As características primárias incluem características que aperfeiçoam ou de alguma forma facilitam a conversão de material vegetal colhido em um produto útil comercialmente. O nível predeterminado da característica primária é obtido pela mistura de material vegetal colhido a partir de pelo menos duas variedades de plantas, onde pelo menos um das variedades apresenta a característica primária. A mistura pode ser personalizada para uso em uma variedade de usos finais agrícolas ou industriais importantes comercialmente.