



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

(11) PI 0701230-6 B1

(22) Data do Depósito: 05/02/2007

(45) Data de Concessão: 26/06/2018



(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MODIFICAR A EXPRESSÃO DE GENES USANDO O PROMOTOR DO GENE DA PROTEÍNA DE CONJUGAÇÃO À UBIQUITINA DE PLANTAS DE ALGODOEIRO

(51) Int.Cl.: C12N 15/29; C12N 15/62; C12N 15/10; C12N 15/82

(73) Titular(es): EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

(72) Inventor(es): MARIA DE FÁTIMA GROSSI DE SÁ; LUCIANE MOURÃO GUIMARÃES; JOÃO AGUIAR NOGUEIRA BATISTA; ANTONIO AMÉRICO BARBOSA VIANA; RODRIGO DA ROCHA FRAGOSO; THALES LIMA ROCHA

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MODIFICAR A EXPRESSÃO DE GENES USANDO O PROMOTOR DO GENE DA PROTEÍNA DE CONJUGAÇÃO À UBIQUITINA DE PLANTAS DE ALGODOEIRO

Campo da Invenção

5 A presente invenção está relacionada a um novo promotor de expressão de genes em plantas. Mais especificamente a invenção refere-se a seqüências regulatórias de polinucleotídeos isoladas de plantas de algodoeiro que são capazes de iniciar e acionar a transcrição de polinucleotídeos, e ao uso destas seqüências regulatórias na modificação de transcrição de polinucleotídeos endógenos e/ou heterólogos e produção de polipeptídeos. A invenção descreve ainda construções de DNA que contém o promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de plantas de algodoeiro que está operacionalmente ligado a um gene heterólogo e/ou endógeno. Além disso, a invenção diz respeito ao uso destas construções na forma de vetores de expressão, vetores recombinantes e em plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos. A invenção
10 ainda descreve um método utilizando tais construções contendo o promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de plantas de algodoeiro para produção de plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos.
15

Fundamentos da Invenção

A expressão de um gene é regulada, em parte, pelos processos celulares envolvidos na transcrição. Durante a transcrição, um RNA de filamento único, complementar à seqüência de DNA a ser transcrita é formado pela ação de polimerases de RNA. A iniciação de transcrição em células eucarióticas é regulada por interações complexas entre motivos de DNA cis-atuantes, localizados dentro do gene a ser transcrito, e fatores de proteína trans-atuantes. Dentre as regiões regulatórias cis-atuantes estão as seqüências de DNA, chamadas promotores, às quais a RNA
20 polimerase é primeiramente ligada, direta ou indiretamente. Para efeitos da presente invenção, o termo "promotor" se refere à seqüências específicas de DNA, usualmente à montante (5') da região codificadora de um gene estrutural, que controla a expressão desta região codificadora devido a sua capacidade de prover um sítio de
25

reconhecimento para a RNA polimerase e/ou outros fatores necessários para o início da transcrição, e que para esta se inicie no local correto do gene.

Tipicamente, um promotor possui um "TATA box" e uma região de ativação à montante. Este TATA box é o responsável pela localização do início da transcrição, aproximadamente 25 pares de base na direção do início da seqüência codificadora do gene (3').

Existem dois tipos básicos de promotores, os induzíveis e os não induzíveis, também chamados constitutivos. Um promotor induzível é um promotor capaz de ativar (direta ou indiretamente) a transcrição de uma ou mais seqüências de DNA ou genes em resposta a um determinado indutor. Na falta deste indutor, as seqüências de DNA ou genes não serão transcritos. O indutor pode ser um componente químico (descrito, por exemplo, no documento de patente WO9519443), um estresse de origem fisiológica (como no caso de ferimentos, que é descrito, por exemplo, no documento de patente US6677505), ou um composto endógeno gerado em resposta à mudanças no desenvolvimento da planta.

Existem inúmeros promotores tecido-específicos descritos para plantas, como é o caso da expressão específica em semente (WO8903887), tubérculo (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil et al., 1989 EMBO J. 8: 1323:1330), folhas (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hudspeth et al., 1989 Plant Mol Biol 12:579-589), fruta (Edwards and Coruzzi (1990) Annu.Rev.Genet. 24, 275 a 303 e US5753475), caule (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1988 EMBO J. 7: 3625-3633), tecidos vasculares (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Peleman et al., 1989 Gene 84: 359-369 e Schmülling et al. (1989) Plant Cell 1, 665-670), raiz (US20060143735 e como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1989 Genes Devel. 3:1639-1646), estames (WO8910396, WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865) e meristema (Ito et al. (1994) Plant Molecular Biology, 24, 863 a 878).

Os promotores constitutivos, por sua vez, são capazes de dirigir a expressão de seqüências de DNA durante todo o desenvolvimento de uma planta, além de não possuir uma especificidade quanto ao local de expressão desta seqüência, sendo esta, então, expressa em uma grande variedade de células e tecidos da planta. Apesar disso, o termo "constitutivo" não implica que a seqüência é expressa nos mesmos níveis em todas as células vegetais.

Com as técnicas de recombinação, é possível ativar o local de início da transcrição de uma seqüência nucleotídica de interesse, como a de uma seqüência heteróloga ou de ocorrência não natural, numa célula hospedeira vegetal.

Os promotores que causam a expressão constitutiva dos genes controlados por eles podem ser utilizados, por exemplo, para selecionar as células vegetais transformadas, na expressão de um gene marcador de seleção em plantas transgênicas, na geração de células vegetais resistentes a antibióticos, ou para geração de vegetais tolerantes a herbicidas, tolerantes a inseticidas e resistentes e ao estresse de patógenos, visto que os produtos dos genes controlados por estes estão presentes em todas as partes do vegetal.

Os genes exógenos de importância agrônômica, medicinal ou outra podem ser expressos em uma variedade de vegetais, por exemplo, para a geração de proteínas recombinantes heterólogas e para a geração de vegetais que contenham polipeptídeos de mamíferos. As quantidades do padrão de expressão no espaço e no tempo, de genes de vegetais endógenos, também podem ser vantajosamente alterados com o auxílio de promotores constitutivamente ativos.

Os primeiros promotores utilizados na expressão de genes em plantas foram de origem viral ou bacteriana, no caso, de bactérias do gênero *Agrobacterium*. Ambos os sistemas apresentam vantagens no caso de expressão heteróloga em plantas, pois esse princípio constitui a base de seu mecanismo de infecção. Muitos destes promotores vêm sendo amplamente utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas, expressando proteínas de interesse.

Além dos promotores derivados do T-DNA de *Agrobacterium* como o responsável pela síntese de manopina (mas), octopina (ocs) e de nopalina (nos), existem os promotores derivados de vírus, onde o mais amplamente utilizado é o CaMV35S, correspondendo ao fragmento promotor 35S do vírus mosaico da couve flor. Mais tarde, este mesmo promotor teve sua região regulatória duplicada e fundida a uma seqüência *enhancer* do vírus mosaico da alfafa, gerando um promotor de plantas recombinante bastante eficiente na indução da expressão de seqüências codificadoras a ele associadas.

Outros promotores constitutivos de origem viral são, por exemplo, o promotor do vírus mosaico de escrofulária (PI1101063-0), do badnavírus que infecta a banana australiana (US6391639) e o promotor do vírus baciloforme da cana-de-açúcar (US6489462). No entanto, os promotores virais e de *Agrobacterium* possuem problemas

em relação a sua capacidade regulatória, podendo ser particularmente instáveis e propensas a transferência horizontal de genes e à recombinação gênica, ressaltando a importância da busca de promotores de origem vegetal.

Os promotores constitutivos intrínsecos de vegetais são, por exemplo, o promotor da alfa tubulina de café (US6441273), o promotor da proteína trealose 6-fosfato sintase de *A. thaliana* (US20020115850), promotores da actina-2, enolase, Gios-2 e L41 de milho (US6670467), promotor da V-ATPase de *Beta vulgaris* (PI0013537-2), promotor hsp80 de Brassica (PI9300296-3).

Apesar de muito desses promotores vegetais apresentarem uma forte expressão, os dados mostrados dos presentes promotores se referem basicamente a uma análise qualitativa. A presente invenção, no entanto, além de apresentar dados qualitativos também apresenta dados quantitativos através do ensaio fluorimétrico demonstrando, através das análises, sua capacidade de alta expressão.

Os promotores acima descritos foram alinhados com a presente invenção, não apresentando identidade significativa entre eles. O melhor alinhamento obtido foi com o promotor de alfa tubulina de café, com 44,3% de identidade. Esse alinhamento pode ser feito utilizando softwares existentes na internet, um deles é o BLASTN, que está disponível na página do National Center for Biotechnology Information/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O promotor da proteína trealose 6-fosfato sintase de *A. thaliana* (US20020115850) mostra uma diminuição da atividade na raiz com o tempo de desenvolvimento da planta. A presente invenção, no entanto apresentou uma alta atividade de expressão nos tecidos de plantas de *Arabidopsis* transgênicas com 3 meses, mostrando que a seqüência uecA1.7 possui capacidade de expressão em altos níveis, não apenas no período de desenvolvimento, mas também na planta madura, o que constitui um alto potencial tecnológico, já que a maioria das plantas são atacadas por insetos-praga ao longo de toda vida.

Para expressar os genes de seleção e os genes de resistência, é desejável ter promotores disponíveis que apresentem uma atividade constitutiva forte e uniforme e ao longo de todo período vegetativo, se possível, em todos os tecidos vegetais ou tipos de células que, além disso, apresentem atividade ainda maior ou que não sejam reprimidos sob condições de estresse.

Mesmo que os promotores supracitados tenham sido caracterizados como constitutivos, os padrões de expressão temporal e espacial se diferem, tornando-os

inapropriados para determinadas aplicações. Portanto, faz-se necessária a prospecção e o estudo de outros promotores de plantas. Além disso, para determinadas aplicações na geração de plantas geneticamente modificadas, são desejáveis altos níveis de expressão, aumentando, assim, os níveis do produto protéico de interesse. Altos níveis da expressão da proteína auxiliam na geração de plantas, exibindo propriedades fenotípicas importantes comercialmente, tais como resistência a insetos-praga e doenças, tolerância a estresse ambiental (por exemplo, seca, altas temperaturas, frio, intensidade luminosa, comprimento do dia, químicos, entre outros), qualidade melhorada (por exemplo, alta produção de frutos, extensão do ciclo de vida, uniformidade da forma e da cor, alto conteúdo de açúcar, alto conteúdo de vitamina C e A, baixa acidez, entre outros).

Promotores podem ser mais efetivos se isolados da mesma espécie da planta transgênica gerada. A expressão da β -glucuronidase (GUS), sob o controle do promotor da actina de arroz (Act1) em protoplastos de arroz transformado, foi aproximadamente 6 vezes maior do que a expressão sob o controle do promotor constitutivo da álcool desidrogenase (Adh1) de milho (US658701). Portanto, além de poder ser utilizado como promotor constitutivo em diversas espécies vegetais, o promotor da presente invenção apresenta grandes vantagens com relação à produção de plantas transgênicas de algodão.

Ubiquitina é uma das proteínas mais conservadas em eucariotos. Uma função fisiológica para ubiquitina é se conjugar com uma proteína alvo como um sinal de reconhecimento para degradação protéica. A degradação seletiva de proteínas anormais é realizada em muitas proteínas regulatórias de vida curta, incluindo proteínas do ciclo celular, moduladores de crescimento celular e fatores de transcrição. Em organismos mais complexos, a ubiquitina tem sido codificada por duas pequenas famílias de genes, denominadas de "genes poliubiquitina" e "genes de fusão de ubiquitina". Genes poliubiquitina compreendem uma repetição em tandem da cabeça para cauda de 228pb, com cada repetição codificando 76 aminoácidos de um monômero de ubiquitina. O número de repetições em tandem reportou variações entre genes dentro dos genomas e entre organismos, de 3 em *Dictostylium* a aproximadamente 50 em *Trypanosoma cruzi*. Por outro lado, a família de gene de fusão de ubiquitina codifica uma repetição simples fusionada com um a dois polipeptídeos com 52 ou 76-80 aminoácidos cada (Callis et al., "Ubiquitin and Ubiquitin Genes in Higher Plants", Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology, (1989), vol.6, pp. 1-30). Estudos de genes de ubiquitina em diferentes plantas mostram que os genes de ubiquitina são expressos em todos os

tecidos; no entanto, a expressão diferencial dos genes de ubiquitina também é visualizada entre a família gênica de ubiquitina. Cada repetição em tandem ou gene de ubiquitina pode ser expresso diferencialmente em células ou tecidos.

Promotores de genes da ubiquitina têm mostrado dirigir a expressão de genes, usualmente GUS ou cloranfenicol acetil transferase (CAT), em células ou plantas transformadas. Tais promotores têm sido isolados de *Arabidopsis* (Callis et al., "Ubiquitin Extension Proteins of *A. thaliana*", The Journal of Biological Chemistry (1990), vol. 265.nº21, pp. 12486-12493); girassol (Binet et al., "Analysis of a sunflower polyubiquitin promoter by transient expression" (1991) Plant Science, vol 79, pp. 87-94); fumo (Genschick et al., "Structure and promotor activity of a stress and developmentally regulated polyubiquitin encoding gene of *Nicotiana tabacum*", Gene, (1994) vol. 148, pp.195-202); milho (US20030066108; US6020190; US5614399; US5510474; Christensen et al., "Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation", Plant Molecular Biology, (1992) vol. 18, pp. 675-689); arroz (US6528701); cana-de-açúcar (US6706948); salsa (WO2003102198); Pinus e eucalipto (PI0309870-2). Tais promotores presentes foram alinhados no BLASTN com a presente invenção, não apresentando similaridade. Os documentos de patente US20030066108; US6020190; US5614399 e US5510474 descrevem versões engenheiradas do promotor da ubiquitina de milho para aumentar os níveis de expressão quando comparados aos níveis de expressão do promotor de ubiquitina nativo. A invenção relata que o promotor regula a expressão do gene poliubiquitina de milho contendo 7 repetições em tandem. A expressão deste gene de ubiquitina se mostrou constitutiva a 25°C, e foi induzida pelo calor a 42°C. O promotor foi utilizado com sucesso para transformar outras plantas monocotiledôneas além do milho, incluindo trigo, cevada e arroz. Porém o promotor da presente invenção apresentou ser um excelente promotor constitutivo, não sofrendo alterações no seu nível de expressão, quando submetido a diferentes temperaturas, além de possuir uma alta expressão ao longo de todo seu ciclo de vida.

O algodão (*Gossypium* spp) é uma das mais importantes culturas mundiais, considerada a mais importante das fibras têxteis. Entre os maiores produtores de algodão do mundo, o Brasil destaca-se pela sua produção, estando entre os principais produtores de algodão mundial. No entanto o aumento do custo da produção é

influenciada por problemas na agricultura, como o controle de insetos praga, que gera custos de cerca de 25% dos custos totais de produção.

Visando o controle desses insetos-praga, a produção de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas que conferem à planta resistência vem sendo utilizada com bastante sucesso. Porém, para a obtenção destas plantas, é necessário o controle e direcionamento da expressão das proteínas entomotóxicas. Para a obtenção de plantas transgênicas com níveis adequados de proteínas que conferem resistência a insetos nas plantas, a escolha de promotores que direcionem a expressão é extremamente importante. No entanto, existem poucos promotores efetivos para expressão em plantas de algodão disponíveis no mercado atualmente, e nenhum tem demonstrado uma eficiência maior de expressão comparado com o promotor da presente invenção.

Sumário da invenção

A presente invenção compreende a descrição de uma nova seqüência regulatória provida para melhorar a expressão de uma seqüência de nucleotídeo, tal como genes estruturais, em plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. De acordo com a presente invenção é descrito um promotor constitutivo de plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) denominado de uceA1.7 junto com um método para uso dessa região regulatória de polinucleotídeo para modificação de expressão de polinucleotídeos endógenos e/ou heterólogos em plantas transgênicas.

Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma seqüência de polinucleotídeo isolada de plantas de algodão (*G. hirsutum*) que possua 40%, preferencialmente 60%, mais preferencialmente 75%, mais preferencialmente ainda 90% de identidade com a SEQ ID NO1; seqüência reversa de SEQ ID NO1; sondas e iniciadores correspondendo à SEQ ID NO1.

Em outro aspecto, a presente invenção provê genes quiméricos compreendendo o polinucleotídeo da presente invenção, ou sozinho, ou em combinação com um ou mais polinucleotídeos conhecidos, junto com células e organismos compreendendo estes genes quiméricos.

Em um aspecto relacionado, a presente invenção provê vetores recombinantes compreendendo, na direção 5'-3', uma seqüência de promotor de polinucleotídeo da presente invenção, um polinucleotídeo a ser transcrito, e uma seqüência de terminação

de genes. O polinucleotídeo a ser transcrito pode compreender uma armação de leitura aberta de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse, ou pode ser uma região de não codificação, ou não traduzida, de um polinucleotídeo de interesse. A matriz de leitura aberta pode ser orientada em uma direção "sense" ou "antisense".

5 Preferivelmente, a seqüência de terminação de genes é funcional em uma planta hospedeira. Mais preferivelmente, a seqüência de terminação de genes é a do gene de interesse, mas podendo ser outras descritas no estado da técnica (vide Benjamin Lewin, Genes VIII, capítulo 9) como o terminador da nopalina sintase de *T. tinctorius*. Os vetores recombinantes podem ainda incluir um marcador para a identificação de células transformadas.

10 Em outro aspecto, as células de plantas transgênicas compreendendo o vetor recombinante da presente invenção são providas, junto com organismos, como plantas, compreendendo estas células transgênicas, e frutos, sementes e outros produtos, derivados, ou progênie destas plantas. Os propágulos das plantas transgênicas inventivas são incluídos na presente invenção.

15 Em outro aspecto da presente invenção é provido um método para modificar a expressão de genes em um organismo, como uma planta, incluindo a incorporação estável no genoma do organismo contendo o vetor recombinante da presente invenção.

20 Em outro aspecto da presente invenção é provido um método para produzir um organismo transformado, como uma planta, tendo a expressão de um polipeptídeo modificada. Esse método compreende transformar uma célula de planta com o vetor recombinante da presente invenção para prover uma célula transgênicas sob condições que conduzem à regeneração e crescimento da planta madura.

25 Ainda em outro aspecto da presente invenção é provido um método para identificação de um gene responsável por uma função ou fenótipo desejado. O método compreende: 1) a transformação de uma célula de planta contendo um vetor recombinante compreendendo uma seqüência de promotor de polinucleotídeos da presente invenção ligada operacionalmente a um polinucleotídeo a ser testado, 2) cultivar a célula de planta sob condições que conduzem a regeneração e crescimento da planta madura de modo a prover uma planta transgênica, e 3) comparar o fenótipo da planta transgênica com o fenótipo de plantas não transformadas, ou de tipo selvagem.

30 Os aspectos acima mencionados e adicionais da presente invenção e o modo de obter os mesmos se tornarão evidentes, e a invenção será melhor compreendida por referência na "Descrição Detalhada da Invenção".

Breve Descrição das Figuras

Figura 1 – Gel de agarose mostrando resultado da amplificação com o primer arbitrário W4 produzindo um fragmento de aproximadamente 1kb. (A) reação com os primers W4 e uce2; (B) reação controle apenas com o primer W4; (C) reação controle apenas com o primer uce2; (D) marcador de massa molecular (*λ*Hind III) indicado em kb. A seta indica o fragmento amplificado potencialmente positivo de aproximadamente 1 kb.

Figura 2 - Vetor pGEM-T ligado ao fragmento de 1kb.

Figura 3 -- Vetor pCAMBIA 1391 ligado ao inserto de 1kb. A figura mostra uma representação esquemática do vetor pCAMBIA 1391. (a) contendo o Promotor 35S duplicado com a seqüência enhancer do AMV (Alfafa Mosaic Vírus) junto ao gene *gusA* como controle positivo e (b) contendo o promotor do algodão uceA1.7 (SEQ ID NO1) de 1 kb junto ao gene *gusA*, para transformação de plantas *A. thaliana*.

Figura 4 –Gel de agarose da subclonagem do promotor de algodão (clone uceA1) no vetor pCAMBIA1391. Os números indicam o número dos clones analisados. Os clones 1, 6, 7 e 8 são positivos. O marcador de massa molecular (1 kb DNA-ladder, Gibco-BRL) está indicado em kb

Figura 5 – Gel de agarose da digestão dos clones uceA1.1 e uceA1.7 com *Hind* III e *Xba* I, para análise da orientação do promotor de algodão (clone uceA1) subclonado no vetor pCAMBIA1391. (A) clone uceA1.1; (B) clone uceA1.7. A seta indica o fragmento de aproximadamente 200 pb esperado da digestão para os clones na orientação sense. Ambos os clones tem o promotor na orientação correta (sense) em relação ao gene *gusA* presente no vetor. O clone uceA1.7 foi escolhido para as manipulações posteriores. O marcador de massa molecular (1 kb DNA-ladder, Gibco-BRL) está indicado em kb.

Figura 6 - Ensaio fluorimétrico da atividade específica de GUS em diferentes partes da planta de *A. thaliana* (folha, caule e botão floral) sob controle dos promotores 35Sd e uceA1.7.

Descrição Detalhada da Invenção

No contexto dessa descrição, inúmeros termos serão utilizados e por isso serão melhor detalhados a seguir:

Um "gene quimérico" é um gene compreendendo um promotor e uma região codificadora de diferentes origens. No caso da presente invenção, o gene quimérico compreende o polinucleotídeo da presente invenção ligado a regiões codificadoras de genes endógenos e ou exógenos.

5 Uma "seqüência consenso" é uma seqüência artificial na qual a base em cada posição representa a base freqüentemente mais encontrada na seqüência atual comparando-se diferentes alelos, genes ou organismos.

Um "promotor" é aquela porção do DNA acima da região codificadora que contém sítios de ligação para RNA polimerase II para iniciar a transcrição do DNA.

10 "Expressão" é a transcrição ou tradução de um gene estrutural, endógeno ou heterólogo.

"GC box" é um elemento comum no promotor que pode aumentar a atividade do promotor.

15 "TATA box" é um elemento no promotor, localizado aproximadamente 30 bases acima do sítio de início da transcrição. O TATA box está associado com fatores de transcrição em geral, incluindo a RNA polimerase II.

O termo "gene" significa uma unidade física e funcional da hereditariedade, representada por um segmento de DNA que codifica uma proteína funcional ou molécula de RNA.

20 Um "gene endógeno" é um gene próprio da célula ou do organismo.

Um "gene heterólogo" é um gene isolado de um organismo doador e recombinado no organismo receptor transformado. É um gene que não é próprio da célula ou do organismo.

25 Um "gene repórter" é uma unidade codificadora cujo produto é facilmente testado, por exemplo, genes CAT, GUS, GAL, LUC e GFP. A expressão de um gene repórter pode ser usada para testar a função de um promotor ligado a esse gene repórter.

O termo "propágulo" como usado na presente invenção significa qualquer parte de uma planta que pode ser usada na reprodução ou propagação, sexual ou assexual, incluindo as mudas.

30 "Sense" significa que a seqüência de polinucleotídeo está na mesma orientação 5'-3' com relação ao promotor.

"Antisense" significa que a seqüência de polinucleotídeo está na orientação contrária com relação a orientação 5'-3' do promotor.

Como usado aqui, o termo "x-mero", como referência a um valor específico de "x", refere-se a uma seqüência compreendendo pelo menos um número específico ("x") de resíduos do polinucleotídeo identificado como SEQ ID NO1. De acordo com formas de realização preferidas, o valor de x é preferivelmente pelo menos 20, mais preferivelmente pelo menos 40, mais preferivelmente ainda pelo menos 60 e mais preferivelmente pelo menos 80. Assim, polinucleotídeos da presente invenção compreendem um polinucleotídeo de 20 meros, 40 meros, 60 meros, 80 meros, 100 meros, 120 meros, 150 meros, 180 meros, 220 meros, 250 meros, 300 meros, 400 meros, 500 meros ou 600 meros identificado como SEQ ID NO1 e variantes dos mesmos.

O termo "polinucleotídeo (s)" como usado aqui, significa um polímero de filamento único ou duplo de bases de deoxiribonucleotídeo ou ribonucleotídeo e inclui moléculas correspondentes de RNA e DNA, incluindo moléculas de HnRNA e mRNA, de filamentos tanto "sense" como "antisense", e compreende cDNA, DNA genômico, e DNA recombinante, assim como polinucleotídeos completamente ou parcialmente sintetizados. Uma molécula de HnRNA contém introns e corresponde a uma molécula de DNA em um modo geralmente um a um. Uma molécula de RNAm corresponde a uma molécula de DNA e HnRNA da qual os introns foram excisados. Um polinucleotídeo pode consistir de um gene completo, ou qualquer porção do mesmo. Os polinucleotídeos "antisense" operáveis podem compreender um fragmento do polinucleotídeo correspondente, e a definição de "polinucleotídeo" inclui assim todos esses fragmentos antisense operáveis. Os polinucleotídeos antisense e técnicas envolvendo polinucleotídeos antisense são bem conhecidos no estado da técnica (Sambrook, J.; E.F.Fritsh and T. Maniatis - Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.)

Os polinucleotídeos descritos na presente invenção são preferencialmente cerca de 80% puros, mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% puros, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 99% puro.

O termo "oligonucleotídeo" refere-se a um segmento relativamente curto de uma seqüência de polinucleotídeo, geralmente compreendendo entre 6 a 60 nucleotídeos. Esses oligonucleotídeos podem ser usados como sondas ou iniciadores ("primers"), onde as sondas podem ser usadas para uso em testes de hibridização e iniciadores para uso na amplificação de DNA por reação de cadeia polimerase.

O termo "sonda" utilizado na presente invenção refere-se a um oligonucleotídeo, polinucleotídeo ou ácido nucléico, sendo RNA ou DNA, se ocorrendo naturalmente como em uma digestão de enzima de restrição purificada ou produzida sinteticamente, que seja capaz de se anelar com ou especificamente hibridizando com um ácido nucléico contendo seqüências complementares à sonda. Uma sonda pode ser ainda de cadeia simples ou cadeia dupla. O comprimento exato da sonda dependerá de muitos fatores, incluindo temperatura, origem da sonda e uso do método. Por exemplo, dependendo da complexidade da seqüência alvo, a sonda de oligonucleotídeo tipicamente contém 15-25 ou mais nucleotídeos, embora ela possa conter menos nucleotídeos. As sondas aqui são selecionadas para serem complementares para diferenciar cadeias de uma seqüência de um ácido nucléico particular. Isto significa que a sonda pode ser suficientemente complementar para ser capaz de "hibridizar especificamente" ou anelar com suas respectivas cadeias-alvo sob uma série de condições pré-determinadas. Conseqüentemente, a seqüência da sonda não necessita refletir exatamente a seqüência complementar do alvo. Por exemplo, um fragmento de nucleotídeo não complementar pode ser ligado ao final 5' ou 3' da sonda, com o restante da seqüência da sonda sendo complementar à cadeia alvo. Alternativamente, bases não complementares ou seqüências longas podem estar intercaladas dentro da sonda se esta tiver complementaridade suficiente com a seqüência do ácido nucléico alvo para anelar especificamente com ele.

O termo "primer" como utilizado aqui refere-se a um oligonucleotídeo, sendo RNA ou DNA, cadeia simples ou cadeia dupla, derivado de um sistema biológico, gerado através de digestão com enzimas de restrição, ou produzido sinteticamente que, quando colocado em um ambiente próprio, é capaz de agir funcionalmente como um iniciador de uma síntese de ácido nucléico dependente de molde. Quando apresentado com um molde de ácido nucléico apropriado, trifosfatos nucleosídeos adequados precursores de ácidos nucléicos, uma enzima polimerase, cofatores adequados e condições tais como temperatura e pH adequados, o primer pode ser estendido em seu terminal 3' pela adição de nucleotídeos pela ação de uma polimerase ou com atividade similar para produzir uma primeira extensão do produto. O 'primer' pode variar em comprimento dependendo de condições particulares e requerimentos para aplicação. Por exemplo, em aplicações de diagnósticos, o 'primer' oligonucleotídeo possui tipicamente de 15-25 ou mais nucleotídeos em comprimento. O 'primer' deve ter complementaridade suficiente com o molde desejado para iniciar a síntese da extensão

do produto desejado. Isso não significa que a seqüência do 'primer' deva representar um complemento exato do molde desejado. Por exemplo, uma seqüência de nucleotídeo não complementar pode ser ligada ao final 5' de um 'primer' complementar. Alternativamente, bases não complementares podem estar intercaladas dentro da seqüência de oligonucleotídeo do 'primer', desde que o 'primer' tenha complementaridade suficiente com a seqüência da cadeia molde desejada para prover funcionalmente um complexo molde-primer para a síntese da extensão do produto.

O termo "hibridizando especificamente" diz respeito à associação entre duas moléculas de ácidos nucléicos de cadeia simples que possuam seqüências suficientemente complementares para permitir tal hibridização sob condições pré-determinadas geralmente descritas no estado da técnica (apostila: Tecnologia de DNA recombinante. Universidade de São Paulo, Capítulo 1, 2003)

Em particular, o termo se refere à hibridização de um oligonucleotídeo com uma seqüência substancialmente complementar contendo uma molécula de DNA ou RNA de cadeia simples da presente invenção. Condições apropriadas necessárias para realização da hibridização específica entre moléculas de ácidos nucléicos de cadeia simples de complementaridade variada estão bem descritas no estado da técnica (apostila: Tecnologia de DNA recombinante. Universidade de São Paulo, Capítulo 4, 2003). Uma fórmula comum para se calcular as condições de estringência requeridas para se ter uma hibridização entre moléculas de ácido nucléico segue abaixo (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press):

$$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} - 16.6 \text{ Log} [\text{Na}^+] - 0.41 (\% \text{G-C}) - 0.63 (\% \text{ formamida}) - 600 \text{ pb no duplex (sonda)}$$

Como ilustração da fórmula acima, usando $[\text{Na}^+] = [0.368]$ e 50% de formamida, com conteúdo de GC de 42% e um tamanho de sonda médio de 200 bases, a T_m será de 57°C .

Sondas ou primers são descritos como correspondendo ao polinucleotídeo da presente invenção identificado como SEQ ID NO1 ou uma variante do mesmo, se a sonda de oligonucleotídeo ou primer, ou seu complemento, estiver contido dentro da seqüência especificada como SEQ ID NO1, ou uma variante desta.

O termo "oligonucleotídeo" é referido aqui como 'primers' e 'sondas' da presente invenção, e é definido como uma molécula de ácido nucléico compreendendo de dois ou mais ribo ou deoxiribonucleotídeos, preferencialmente mais do que três. O

tamanho exato dos oligonucleotídeos dependerá de vários fatores e na aplicação particular e uso dos oligonucleotídeos. Oligonucleotídeos preferidos compreendem 15-50 pares de base consecutivas complementares à SEQ ID NO 1. As sondas podem ser facilmente selecionadas usando procedimentos bem descritos no estado da técnica (Sambrook et al "Molecular Cloning, a laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), levando em consideração estringências de hibridização DNA-DNA, recombinação e temperaturas de fusão, e potencial para formação de laços e outros fatores, que são conhecidos no estado da técnica.

A definição dos termos "complemento", "complemento reverso" e "seqüência reversa", como usados aqui, é ilustrada pelo seguinte exemplo. Para a seqüência 5'AGTGAAGT3', o complemento é 3'TCACTTCA5', o complemento reverso é 3'ACTTCACT5' e a seqüência reversa é 5'TGAAGTGA3'.

Como usado aqui, o termo "variante" ou "substancialmente similar" compreende seqüências de aminoácidos ou nucleotídeos diferentes de seqüências especificamente identificadas, em que um ou mais nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos é deletado, substituído ou adicionado. As variantes podem ser variantes alélicas, de ocorrência natural, ou variantes de ocorrência não natural. As seqüências variantes ou substancialmente similares dizem respeito a fragmentos de ácidos nucléicos que podem ser caracterizados pela porcentagem de similaridade de suas seqüências de nucleotídeos com a seqüências de nucleotídeo descrita aqui (SEQ ID NO 1), como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucléicos preferidos são aqueles cujas seqüências de nucleotídeos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de seqüência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência quando comparada com a seqüência de referência. A identidade percentual é determinada por alinhamento de duas seqüências a serem comparadas, determinando o número de resíduos idênticos na porção alinhada, dividindo este número pelo número total de resíduos na seqüência pesquisada e multiplicando o resultado por 100. Esse alinhamento pode ser feito através de softwares existentes na internet, um deles é o BLASTN, que está disponível na página do National Center for Biotechnology Information/NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O termo "vetor" diz respeito a um replicon, tal como plasmídeo, cosmídeo, bacmídeo, fago ou vírus, no qual outras seqüências genéticas ou elementos (seja DNA ou RNA) possam ser ligadas para serem replicadas juntas com o vetor. Preferencialmente o vetor derivado de vírus é selecionado entre os bacteriófagos, vaccínias, retrovírus ou vírus do papiloma bovino. O "vetor recombinante" é resultante da combinação de um vetor comercial com genes quiméricos, ou o polinucleotídeo da presente invenção operacionalmente ligado a um polinucleotídeo endógeno e/ou heterólogo de interesse que por sua vez está operacionalmente ligado a um sinal de terminação. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.). Alguns exemplos de vetores utilizados na presente invenção, mas não limitados a, são os vetores pGEM-T, pCAMBIA 1391.

O termo "seqüências acentuadoras de expressão" conhecidas como amplificadores ("enhancers"), que podem estar muito distantes do promotor (antes ou depois, "upstream" ou "downstream") e que potenciam a taxa de transcrição. Estes amplificadores não são específicos e potenciam a transcrição de qualquer promotor que estiver na sua vizinhança. A eficiência da expressão de um gene em um tecido específico depende da adequada combinação e integração dos amplificadores, dos promotores e das seqüências adjacentes.

O primeiro intensificador descoberto que estimulava a transcrição de genes eucariotos foi o SV40 (Presente no genoma do Vírus 40 de Símio) Após a descoberta do intensificador SV40 foram identificados centenas de outros enhancer como HSV-1, AMV, HPV-16, em outros genomas virais no DNA de células eucarióticas. (Lodish et al, Biologia celular e molecular, 4ª edição pág 368)

O termo "operacionalmente ligado" significa que as seqüências regulatórias necessárias para expressão da seqüência codificadora são colocadas na molécula de DNA em posições apropriadas relativa à seqüência codificadora para efeito de expressão da seqüência codificadora. Essa mesma definição é às vezes aplicada para o arranjo de seqüências codificadoras e elementos controladores da transcrição (por exemplo, promotores, auxiliares ou "enhancers" e elementos ou seqüências de terminação) no vetor de expressão. Uma região codificadora exógena é tipicamente flanqueada por regiões regulatórias operacionalmente ligadas que regulam a expressão da região codificadora exógena em uma célula transformada (podendo ser

microorganismo, vegetal ou animal). Uma região regulatória típica operacionalmente ligada a uma região codificadora exógena inclui um promotor, isto é, um fragmento de ácido nucléico que pode causar transcrição de regiões codificadores exógenas, posicionado na região 5' da região codificadora exógena. No caso da presente invenção

5 a região regulatória diz respeito às regiões substancialmente similares à SEQ ID NO 1. Para auxiliar no aumento da transcrição de um determinado polinucleotídeo, a seqüência promotora da presente invenção poderá estar ligada a outras seqüências regulatórias já descritas, tais como: ATATT (elemento de forte expressão na raiz), AACAAAC e GCCACCTCAT (elementos relativos a expressão específica em sementes), CACGTG e
10 CCTACC (ambas seqüências podem ser estimuladas ao um fator de estresse), entre outros. (Ai-Min Wu et al, Isolation of a cotton reversibly glycosylated polypeptide (GhRGPI) promoter and its expression activity in transgenic tobacco, Journal of Plant Physiology 163 (2006) 426—435)

Uma “seqüência de terminação” é uma seqüência de DNA que sinaliza o final da
15 transcrição. São exemplos de seqüências de terminação, mas não estão limitados a sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação
20 do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene trpC de *Aspergillus nidulans* e outros semelhantes. A presente invenção provê uma região regulatória de polinucleotídeos isolados que podem ser empregadas na
25 manipulação de fenótipos de plantas, junto com polinucleotídeos isolados compreendendo estas regiões regulatórias. Mais especificamente a presente invenção está relacionada ao promotor ou seqüência regulatória que ocorre naturalmente em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*), responsável pela expressão da proteína de conjugação à ubiquitina nessa espécie vegetal. O promotor de algodão foi isolado do
30 gene responsável pela expressão da proteína de conjugação à ubiquitina foi denominado na presente invenção de uce A1.7 (SEQ ID NO1).

A quantidade de um polipeptídeo de interesse específico pode ser aumentada ou reduzida através da incorporação de cópias adicionais de genes, ou seqüências de codificação, codificando o polipeptídeo, ligado operacionalmente a seqüência de

promotor da presente invenção (SEQ ID NO 1), no genoma de um organismo, como uma planta. Similarmente, um aumento ou uma diminuição na quantidade do polipeptídeo pode ser obtido por transformação de planta com cópias antisense destes genes.

5 O polinucleotídeo da presente invenção foi isolado de plantas de algodão, mais especificamente de *G. hirsutum*, mas ele pode ser alternativamente sintetizado usando técnicas de síntese convencionais. Especificamente o polinucleotídeo isolado da presente invenção inclui a seqüência identificada como SEQ ID NO1; o complemento reverso da seqüência identificada como SEQ ID NO1; complemento reverso da seqüência identificada como SEQ ID NO1.

10 Estudos da atividade do promotor da presente invenção são detalhados nos exemplos deste relatório. Dados experimentais feitos em plantas de *Arabidopsis* quantificando a atividade GUS demonstraram que o vetor recombinante contendo o promotor uce A1.7 possui maior atividade GUS quando comparado com promotor CaMV35Sd.

15 O polinucleotídeo da presente invenção pode ser identificado em seqüências de DNA genômico de plantas para as quais a informação da seqüência de genoma é disponível ao público, ou isolado de várias bibliotecas de polinucleotídeos, ou pode ser sintetizado usando técnicas que são bem conhecidas no estado da técnica (Sambrook et al "Molecular Cloning, a laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 20 1989) O polinucleotídeo pode ser sintetizado, por exemplo, usando sintetizadores automatizados de oligonucleotídeos (por exemplo, sintetizador de DNA OLIGO 1000M Beckman) para obter segmentos de polinucleotídeos de até 50 ou mais ácidos nucléicos. Uma pluralidade pluralidade destes segmentos de polinucleotídeos podem ser então 25 ligados usando técnicas de manipulação de DNA padrões que são bem conhecidas no estado da técnica (Sambrook et al "Molecular Cloning, a laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Uma técnica de síntese de polinucleotídeo convencional e exemplar envolve a síntese de um segmento de polinucleotídeo de filamento único, tendo, por exemplo, 80 ácidos nucléicos, e hibridizando este segmento 30 a um segmento de 85 ácidos nucléicos complementar, sintetizados, para produzir um 'overhang' de 5 nucleotídeos. O próximo segmento pode ser então sintetizado de modo similar, como um 'overhang' de 5 nucleotídeos no filamento oposto. As extremidades "pegajosas" ou coesivas asseguram uma ligação apropriada quando as duas porções são

hibridizadas. Deste modo, o polinucleotídeo desta invenção pode ser sintetizado completamente *in vitro*.

Como observado acima, a seqüência de promotor da presente invenção pode ser empregada em vetores recombinantes e/ou de expressão para acionar a transcrição e/ou expressão de um polinucleotídeo de interesse. O polinucleotídeo de interesse pode ser endógeno ou heterólogo para um organismo, por exemplo, uma planta, a ser transformada. Os vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção podem ser assim empregados para modular níveis de transcrição e/ou expressão de um polinucleotídeo, por exemplo, um gene que está presente na planta de tipo selvagem, ou pode ser empregado para prover transcrição e/ou expressão de uma seqüência de DNA que não é encontrada na planta de tipo selvagem, incluindo, por exemplo, um gene que codifica um gene repórter, como GUS.

Em algumas formas de realização da presente invenção, o polinucleotídeo de interesse compreende uma matriz de leitura aberta que codifica um polipeptídeo de interesse. A matriz de leitura aberta é inserida no vetor em uma orientação sense e a transformação com essa construção genética/vetor recombinante irá geralmente resultar em super-expressão do polipeptídeo selecionado. O polipeptídeo de interesse, que será regulado pelo promotor da presente invenção, poderá ser inserido no vetor na orientação sense, antisense ou em ambas as direções. A transformação com um vetor recombinante e/ou de expressão contendo o promotor da invenção regulando a expressão do polinucleotídeo de interesse na orientação antisense ou em ambas as orientações (sense e antisense) irá geralmente resultar na expressão reduzida do polipeptídeo selecionado.

O polinucleotídeo de interesse, como uma seqüência de codificação, é ligado de modo operativo em uma seqüência do promotor de polinucleotídeo da presente invenção de modo que uma célula hospedeira é capaz de transcrever um RNA acionado pela seqüência do promotor ligada ao polinucleotídeo de interesse. A seqüência do promotor de polinucleotídeo está geralmente posicionada na extremidade 5' do polinucleotídeo a ser transcrito. O uso de promotor constitutivo, como a seqüência do promotor do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de *G. hirsutum* identificada como SEQ ID NO1, irá afetar a transcrição do polinucleotídeo de interesse em todas as partes da planta transformada.

O vetor recombinante ou vetor de expressão da presente invenção também pode conter um marcador de seleção que é eficaz em células do organismo, como uma planta, para permitir a detecção de células transformadas contendo o vetor recombinante

inventivo. Estes marcadores, que são bem conhecidos, tipicamente conferem resistência a uma ou mais toxinas. Um exemplo deste marcador é o gene *npIII*, cuja expressão resulta em resistência a canamicina ou neomicina, antibióticos que são geralmente tóxicos para células de plantas em uma concentração moderada. As células transformadas podem ser assim identificadas por sua capacidade de crescer em meio contendo o antibiótico em questão. Outros marcadores que podem ser utilizados para construir vetores recombinantes e/ou de expressão contendo o polinucleotídeo da presente invenção podem ser, mas não estão limitados a: gene *hpt* confere resistência ao antibiótico higromicina, gene *manA* e o gene *bar*.

- 10 O sistema que usa o gene *manA* (que codifica a enzima PMI - phosphomannose isomerase) de *Escherichia coli* (Miles e Guest, 1984. Complete nucleotide sequence of the fumarase gene *fumA*, of *E. coli*. Nucleic Acids Res. 1984 April 25; 12(8): 3631-3642), tendo a manose como agente seletivo, é um dos novos sistemas sugeridos como alternativos aos dois primeiros descritos acima (Joersbo et al., 1998 Parameters
-15 interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. Physiologia Plantarum Volume 105 Issue 1 Page 109 - January 1999 doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105117.x). As espécies vegetais que não metabolizam manose sofrem severa inibição de crescimento quando esta é oferecida como única fonte de carbono em meio de cultura. Os efeitos adversos e inibitórios do uso da
20 manose são conseqüências do acúmulo de manose-6-fosfato, produto da fosforilação da manose por uma hexoquinase. PMI promove a interconversão de manose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, permitindo assim que a primeira possa ser catabolizada na via glicolítica (Ferguson e Street, 1958. Análise de sistemas gene marcador agente seletivo alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro.
25 *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 2001, vol.13, no.3, p.365-372. ISSN 0103-3131. : Malea et al., 1967 Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes. Physiologia Plantarum Volume 111 Issue 3 Page 269 - March 2001 doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110301.x). O gene *bar* (que codifica a enzima PAT - phosphinothricin-N-acetyltransferase) de *Streptomyces hygroscopicus* (Murakani et al., 1986 The bialaphos
30 biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. Molecular and General Genetics., 205: 42-50, 1986.), tendo o glufosinato de amônio (PPT) como agente seletivo, é, dentre os sistemas tipo *gene de tolerância a herbicida*, um dos mais amplamente empregados pela

engenharia genética no desenvolvimento de OGMs vegetais. PAT inativa herbicidas que apresentam o PPT como composto ativo mediante detoxificação deste. A detoxificação, que é resultante da acetilação do grupamento amino livre presente no PPT, torna este incapaz de competir de forma inibitória com a glutamina sintetase (GS), possibilitando assim a remoção da amônia tóxica da célula vegetal pela conversão de glutamato em glutamina, reação esta catalizada pela GS (Lindsey, 1992 Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes, *Nature* 360, 481 - 484 (03 December 1992); doi:10.1038/360481a0).

Alternativamente, a presença do gene quimérico em células transformadas pode ser determinada por meio de outras técnicas conhecidas no estado da técnica (Sambrook et al "Molecular Cloning, a laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), como Southern e PCR.

As técnicas para ligar de modo operativo os componentes dos vetores recombinantes ou de expressão inventivos são bem conhecidas no estado da técnica e incluem o uso de ligadores sintéticos contendo um ou mais sítios de endonuclease de restrição, como descrito, por exemplo, em Sambrook et al ("Molecular Cloning, a laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Genes quiméricos da presente invenção podem ser ligados a um vetor tendo, pelo menos um sistema de replicação, por exemplo, *E.coli*, assim após cada manipulação, as construções resultantes podem ser clonadas e seqüenciadas.

Vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção podem ser usados para transformar uma variedade de organismos incluindo, mas não limitando a plantas. As plantas que podem ser transformadas usando vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção incluem angiospermas monocotiledôneas (por exemplo gramíneas, milho, grãos, aveia, trigo e cevada...), angiospermas dicotiledôneas (por exemplo *Arabidopsis*, tabaco, legumes, alfafa, aveia, eucalipto, bordo...), e gimnospermas (por exemplo pinheiro, espruce branco, lariço...). Os protocolos de transformação de plantas já são bem conhecidos no estado da técnica (Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, Capítulo 3 e 7, 1998). Em uma forma de realização preferida, os vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção são empregados para transformar plantas dicotiledôneas. Preferivelmente, a planta é selecionada da família das Malvaceae, mais preferivelmente da espécie *Gossypium hirsutum*. Outras plantas podem

ser transformadas de modo útil com o vetor recombinante e ou de expressão da presente invenção incluem, mas não são limitadas a: *Anacardium*, *Anona*, *Arachis*, *Artocarpus*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Carica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoseyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pannisetum*, *Passiflora*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Psidium*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna*, e *Zea*.

10 O sinal de terminação da transcrição e a região de poliadenilação da presente invenção inclui, mas não está limitado a, sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *A. tumefasciens* (nos), sinal de terminação do gene *RNA 35S* do CaMV, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*, e outros semelhantes. Preferivelmente o terminador utilizado na presente invenção é o terminador do gene que codifica para a proteína de conjugação à ubiquitina de algodão.

Os vetores recombinantes e/ou de expressão da invenção podem ser introduzidos dentro do genoma da planta hospedeira desejada através de uma variedade de técnicas convencionais. Por exemplo, introdução mediada por *A. tumefasciens*; eletroporação; fusão de protoplasto; injeção em órgãos reprodutivos; injeção em embriões imaturos; microinjeção de protoplastos de células de plantas; utilizando-se métodos balísticos, tais como bombardeamento de partículas recobertas com DNA e outros. A escolha da técnica irá depender da planta a ser transformada. Por exemplo, plantas dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas e gimnospermas podem ser transformadas por tecnologia de plasmídeo Ti de *Agrobacterium*. Os vetores recombinantes e/ou de expressão podem ser combinados com regiões flanqueadoras de T-DNA apropriadas e introduzidas dentro de vetor convencional hospedeiro *A. tumefasciens*. A função de virulência do hospedeiro *A. tumefasciens* direcionará a inserção das construções gênicas e marcador adjacente dentro do DNA da célula vegetal quando a célula é infectada pela bactéria. Técnicas de transformação mediadas por *A. tumefasciens*, incluindo desarmamento e o uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica (como mencionado no pedido de patente US 20020152501, Horsch et al. Science 233:496-498, 1984; e Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803, 1983).

Técnicas de microinjeção são conhecidas no estado da técnica e bem descritas em literatura científica e patentária. A introdução de vetores recombinantes e/ou de expressão utilizando-se precipitações de polietileno glicol é descrita em Paszkowski et al. *Embo J.* 3:2717-2722, 1984 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de eletroporação são descritas em From et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824, 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de transformações balísticas são descritas em Klein et al. *Nature* 327:70-73, 1987 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). A introdução dos vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção pode ser feita em tecidos, como tecido de folha, células dissociadas, protoplastos, sementes, embriões, regiões meristemáticas, cotilédones, hipocotilédones, e outros. Preferencialmente a presente invenção utiliza a transformação através da introdução mediada por *A. tumefaciens* utilizando a *A. thaliana* com planta modelo (Clough et al. "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. thaliana*", *Plant J.* 1998 Dec;16(6):735-43.). No entanto outros métodos de transformação podem ser utilizados para inserir vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção, tais como a biobalística, que consiste em uma técnica de transformação direta do DNA que utiliza microprojéteis impulsionados em alta velocidade para carrear o DNA para dentro das células [Rech, E.L; Aragão, F.J.L. Biobalística. In: Manual de Transformação Genética de Plantas (Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C. eds.), EMBRAPA Serviço de Produção de Informações -SPI, 1998, 106pp], e via tubo polínico. O método de transformação via tubo polínico foi divulgado pela primeira vez por Zhou et al (Zhou, G., Wang, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S., and Liu, G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Meth. in Enzymol.* 101:433-448, 1983) e consiste na aplicação de uma solução de DNA na parte superior da maçã jovem após a polinização. Utilizando esta técnica, o DNA exógeno pode alcançar o ovário através da passagem deixada pelo tubo polínico e integrar as células zigóticas já fertilizadas, porém não divididas.

Uma vez que as células foram transformadas, por qualquer uma das técnicas mencionadas acima, as células tendo o vetor recombinante e/ou de expressão da presente invenção incorporado em seu genoma podem ser selecionadas por meio de um marcador, como o marcador de resistência a higromicina ou a canamicina. As células de plantas transformadas podem então ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e, finalmente, o fenótipo desejado. Tais técnicas de

regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a seqüência de nucleotídeos desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans et al. (Evans et al. Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985, como mencionado no pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são bem descritas no estado da técnica, tais como em Leelavathi et al. [Leelavathi et al. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*G. hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants, Plant Cell Rep (2004) 22:465-470]. Esse trabalho descreve um protocolo para transformação e regeneração do algodão onde o calo embriogênico com *Agrobacterium*, é cultivado sob estresse de desidratação e seleção de antibiótico por 3 a 6 meses para a regeneração de diversos embriões transgênicos, uma média de 75 embriões globular. Sendo observado sobre a seleção de placas esses embriões são cultivados e multiplicados no meio, seguido pelo desenvolvimento de embriões cotiledonares sobre o meio de maturação do embrião. Para se obter uma média de 12 plantas por placas de petri de calos co-cultivados. Aproximadamente 83% dessas plantas são transgênicas. As plantas transformadas resultantes podem ser reproduzidas de modo sexual ou assexuado, usando métodos conhecidos no estado da técnica [Leelavathi et al. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossipium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants, Plant Cell Rep, 2004, 22: 465-470], para dar gerações sucessivas de plantas transgênicas.

A produção de RNA em células pode ser controlada por escolha da seqüência do promotor, por seleção do número de cópias funcionais ou através do sítio de integração de polinucleotídeos incorporados no genoma hospedeiro. Um organismo pode ser transformado utilizando um vetor recombinante e/ou de expressão da presente invenção contendo mais de uma matriz de leitura aberta de codificação para um polipeptídeo de interesse.

O polinucleotídeo isolado da presente invenção também tem utilidade no mapeamento do genoma, em mapeamento físico e em clonagem posicional de genes. A seqüência identificada como SEQ ID NO1 e suas variantes podem ser usadas para

projetar sondas e iniciadores de oligonucleotídeos. As sondas de oligonucleotídeos projetadas usando o polinucleotídeo da presente invenção podem ser usadas para detectar a presença do promotor da proteína de conjugação à ubiquitina em qualquer organismo tendo seqüências de DNA suficientemente similares em suas células usando técnicas bem conhecidas no estado da técnica, como as técnicas de hibridização de DNA dot blot (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd edition [M], New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)

Os iniciadores de oligonucleotídeos projetados usando o polinucleotídeo da presente invenção podem ser usados para ampliações de PCR. O polinucleotídeo da presente invenção também pode usado para etiquetar ou identificar um organismo ou material reprodutivo do mesmo. Esta etiqueta pode ser obtida, por exemplo, por introdução estável de um identificador de polinucleotídeo heterólogo, não funcional, não disruptivo, em um organismo, sob o controle do polinucleotídeo da presente invenção.

Exemplos

A presente invenção é ainda definida nos seguintes exemplos. Deve ser entendido que esses Exemplos, enquanto indicam parte da invenção, são colocados como forma de ilustração somente, não tendo, portanto, qualquer cunho limitante do escopo das presentes invenções.

Técnicas usuais de biologia molecular tais como transformação de bactérias e eletroforese em gel de agarose de ácidos nucleicos são referidos através de termos comuns para descrevê-los. Detalhes da prática dessas técnicas, bem conhecidos no estado da técnica, são descritos em Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). Várias soluções utilizadas nas manipulações experimentais são referidas por seus nomes comuns tais como "agarose", "TBE", "miniprep", etc. As composições dessas soluções podem ser encontradas na referência Sambrook, et al. (supracitada).

Exemplo 1

Isolamento da seqüência de DNA promotora do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de Gossypium hirsutum

A extração do DNA em algodão foi realizado através do Kit DNeasy plant mini Kit 50 da QUIAGEN. A seqüência de DNA responsável pela expressão do gene da proteína de conjugação à ubiquitina foi isolada de plantas de algodão utilizando a

técnica de "Tail-PCR". O "Tail-PCR" (Thermal Asymmetric Interlaced PCR) consiste numa aplicação da técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) que permite o isolamento de segmentos de DNA adjacentes a sequências conhecidas utilizando iniciadores específicos seqüenciais junto com pequenos iniciadores arbitrários degenerados de modo a controlar termicamente a eficiência de amplificação relativa de produtos específicos e inespecíficos (Liu, Y. & Whittier, R.F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25, 674-681.)

Intercalando-se ciclos de alta e baixa estringência, produtos específicos são preferencialmente amplificados sobre produtos não específicos. Foram feitas sequencialmente três reações de PCR (reação primária, reação secundária e reação terciária) utilizando três iniciadores seqüenciais específicos de um lado e um iniciador arbitrário do outro.

1) **Reação primária:**

Foram colocados 200ng do DNA genômico do algodão cv. IAC 98/708, em 20 µl de uma reação de PCR contendo 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4, (Gibco PCR buffer) 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 400 nM primer UCE1 (5' GCTTGCCAATGGAACAT 3'), 3 µM primer AD3 (5' WGTGNAGWANCANAG 3'), 1 U Taq DNA polimerase (Gibco). A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient) programado para 38 ciclos, com uma etapa inicial de 1 min a 93 °C, seguindo as seguintes etapas: 1min a 95 °C, 94 °C, 55 °C, 2,5 min 72 °C, voltar para o passo 3 (1 min a 94 °C) repetir 4 vezes, 3min a 25 °C, 2,5 min a 72 °C, 30 segundos a 94 °C, 1 min a 60 °C, 2,5 min a 72 °C, voltar ao passo de 30 segundos a 94 °C repetir 1 vez, 30 segundos a 94 °C, 1 min a 44 °C, 2,5 min a 72 °C, voltar ao passo de 30 segundos a 94 °C e repetir 14 vezes, finalizando a 72 °C por 5 min

2) **Reação secundária:**

Foi adicionado 1 µl do produto da reação primária a 20 µl de uma reação de PCR contendo 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4, (Gibco PCR buffer) 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 400 nM primer UCE2 (5' AGRTCCTTIAGCTCCTT 3'), 2 µM primer AD3 (5' WGTGNAGWANCANAG 3'), 0.6 U Taq DNA polimerase (Gibco). A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient) programado para 13 ciclos, com uma etapa inicial de 30 segundos a 94 °C, seguindo as seguintes etapas: 1 min a 55 °C, 2,5 min 72 °C, voltar para o passo inicial e repetir 1 vez, 94 °C

por 30 segundos, 44 °C por 1 min, 72 °C por 2,5 min, voltar para o passo inicial e repetir 11 vezes, finalizando a 72° C por 5 min.

3) Reação terciária:

Foi adicionado 1 µl do produto da reação secundária a 20 µl de uma reação de PCR contendo 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4, (Gibco PCR buffer) 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 400 nM primer W4 (5' AGWGNAGWANCANAGA 3') 0.6 U Taq DNA polimerase (Gibco). A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf, Mastereycler gradient) programado para 13 ciclos, com uma etapa inicial de 30 segundos a 94 °C, seguindo as seguintes etapas: 1 min a 55 °C , 2,5 min 72 °C, voltar para o passo inicial e repetir 1 vez, 94 °C por 30 segundos, 44 °C por 1 min, 72 °C por 2,5 min, voltar para o passo inicial e repetir 11 vezes, finalizando a 72° C por 5 min.

A amplificação com o primer arbitrário W4 produziu um fragmento de aproximadamente 1.0 kb potencialmente positivo. Baseado nos controles do TAIL-PCR foram feitas como controle reações apenas com os primers arbitrários e outra apenas com o primer UCE2. Foram considerados como potencialmente positivos os produtos amplificados na reação com os dois primers (W4 e UCE2) e que não estavam presentes nos controles apenas com um dos primers (Figura 1).

O produto do PCR foi submetido a eletroforese em agarose-TBE e o fragmento amplificado de 1.0 kb foi purificado com o kit 'Gene Clean' (QIAGEN) e ligado ao vetor pGEM-T (Promega). O vetor recombinante resultante (Figura 2) foi usado para transformar células de *E. coli* por eletroporação (Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 101. p.). Doze clones foram selecionados e o seu DNA purificado através de preparação de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep) [Sambrook, et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Os 12 clones foram seqüenciados em um seqüenciador automático ABI usando os primers T7 e SP6. O seqüenciamento foi feito na plataforma de seqüenciamento da Embrapa-Cenargem e confirmados como positivos através da análise das seqüências. Seis clones apresentavam o promotor na orientação 'antisense' em relação ao gene *lacZ* presente no vetor e seis apresentavam o promotor na orientação 'sense' em relação ao *lacZ* do vetor.

As seqüências resultantes geraram uma seqüência consenso à SEQ ID NO 1, com base no alinhamento das seqüências dos clones positivos com a seqüência do promotor do algodão.

A análise da seqüência do gene de algodão isolado correspondente a família do gene Leube4 revelou a existência de segmento similar ao consenso TATA box presente usualmente em promotores de eucariotos. Adicionalmente, a comparação da seqüência obtida com outras seqüências depositadas nos bancos de dados não revelou qualquer similaridade significativa, assim como também não foram detectadas seqüências abertas de leitura significativas, indicando que a região não corresponde a uma seqüência codificadora.

Exemplo 2

A análise comparativa da seqüência promotora uceA1.7 do gene da proteína de conjugação de ubiquitina de algodão com outros promotores constitutivos de plantas, mostrou que o promotor uceA1.7 é significativamente diferente dos promotores descritos na literatura, como mostra o alinhamento abaixo:

```

15 Arabidopsis -----
    Uce_Oryza_3 -----
    Gos-2_Zea -----
    Uce_Oryza_1 -----
    A-Tubulin_Coffea_1 -----AAAAGTTGTAGCGGGA 16
    Uce_Oryza_4 -----
20 UBI9_Saccharum -----
    Enolase_Zea -----
    Actin-2_Zea -----
    Uce_Oryza_2 CTGCAGAAATGCAAATTTTCATAAAACAACTACTAGTACTGTTTGTTCATTGGTCTTATC 60
    UceA1.7 -----
25 A-Tubulin_Coffea_2 -----
    35Sd_AMV -----

    Arabidopsis -----
    Uce_Oryza_3 -----
30 Gos-2_Zea -----
    Uce_Oryza_1 -----
    A-Tubulin_Coffea_1 GGGCTGGACGATGCGTGGAGCGGAAATGCTGGAGTATTGGACCACCAACCAACAAAAT 76
    Uce_Oryza_4 -----
35 UBI9_Saccharum -----
    Enolase_Zea -----
    Actin-2_Zea -----
    Uce_Oryza_2 CAAAACCTTAGCCACTGCAACAAGTTCTTGAACCTTAGCACAATCATATGTGCATGCACCT 120
    UceA1.7 -----
40 A-Tubulin_Coffea_2 -----
    35Sd_AMV -----

    Arabidopsis -----
    Uce_Oryza_3 -----
45 Gos-2_Zea -----
    Uce_Oryza_1 -----
    A-Tubulin_Coffea_1 AGTTTTAGTATATGGGGTTTCGAACTTCCAGTCAACCTACAACAATCTGCTTCTATAAA 136
    Uce_Oryza_4 -----
    UBI9_Saccharum -----
    Enolase_Zea -----
50 Actin-2_Zea -----
    Uce_Oryza_2 TGTTTTATGCAAAGAATGGTGGCTAGGGAACACGCATGATTTTGAATTGCTGGCACATA 180
    UceA1.7 -----
    A-Tubulin_Coffea_2 -----
    35Sd_AMV -----

55 Arabidopsis -----

```

	Uce_Oryza_3	-----	
	Gos-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_1	-----	
5	A-Tubulin_Coffea_1	CAATAATAAAAAGAGTAATIAAATFACTGGTAGCGTTGGTGTATTTGGATTGGCCAGCTTT	196
	Uce_Oryza_4	-----	
	UBI9_Saccharum	-----	
	Enolase_Zea	-----	
	Actin-2_Zea	-----	
10	Uce_Oryza_2	ATTTTATCATTAGAACTGGAATGCAACATGTACCCTTTGTCATGTTTCTTTCCGAGAC	240
	UceAl.7	-----	
	A-Tubulin_Coffea_2	-----	
	35Sd_AMV	-----	
	Arabidopsis	-----	
15	Uce_Oryza_3	-----	
	Gos-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_1	-----	
	A-Tubulin_Coffea_1	GCTTCCAAACTCATATCATCAATTTGATAGCACTTGGATACGGAGATCGCTTTTGTCTGC	256
	Uce_Oryza_4	-----	
20	UBI9_Saccharum	-----	
	Enolase_Zea	-----	
	Actin-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_2	ATTGCACTGTTTTTTTAAATCCTATCATTATCATAATGCCAAGAACTGGTCACCAACCAG	300
	UceAl.7	-----	
25	A-Tubulin_Coffea_2	-----	
	35Sd_AMV	-----	
	Arabidopsis	-----	
30	Uce_Oryza_3	-----	
	Gos-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_1	-----	
	A-Tubulin_Coffea_1	CTTAGTATGATATGATTGCTCACCCGCTGTAGACATGATTTAAAGGAAAATAACACAAAT	316
	Uce_Oryza_4	-----	
35	UBI9_Saccharum	-----	
	Enolase_Zea	-----	
	Actin-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_2	CATTTTGCATCATGGTTAGTTGAGCTGTCCCATGTATCAATAGGTGCATTGTATTGGTC	360
	UceAl.7	-----	
40	A-Tubulin_Coffea_2	-----	
	35Sd_AMV	-----	
	Arabidopsis	-----	
45	Uce_Oryza_3	-----	
	Gos-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_1	-----	
	A-Tubulin_Coffea_1	ATATATATATAAGACCAACAAATATAACTGAAAACCTTTTCAGTAATGTTAATTCTAACA	376
	Uce_Oryza_4	-----	
50	UBI9_Saccharum	-----	
	Enolase_Zea	-----	
	Actin-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_2	CAAAATATAAATGCAGTGGATGCAACCTATCTCATGGCCGTCAACAAAAGAAATCAAAAG	420
	UceAl.7	-----	
55	A-Tubulin_Coffea_2	-----	
	35Sd_AMV	-----	
	Arabidopsis	-----	
60	Uce_Oryza_3	-----	
	Gos-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_1	-----	
	A-Tubulin_Coffea_1	CATGTGACTAGACCTGCTATCATCAGCTGCAATTCTAGAGGAACTTGGACCAGATCAGA	436
	Uce_Oryza_4	-----	
	UBI9_Saccharum	-----	
	Enolase_Zea	-----	
65	Actin-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_2	GGAAATGCACCATCTTATATCTCCAGTTTATATGAACAGATTGGATAAGATCATAAGATC	480
	UceAl.7	-----	
	A-Tubulin_Coffea_2	-----	
	35Sd_AMV	-----	
70	Arabidopsis	-----	

Uce_Oryza_3
Gos-2_Zea
Uce_Oryza_1
5 A-Tubulin_Coffea_1 AGTTGTAAAGGGCTGCAGTCCATTCTGTCACCTATTTCAGTTTGGCAGGTAGATGGGTGGACG 49
Uce_Oryza_4
UBI9_Saccharum
Enolase_Zea
Actin-2_Zea
10 Uce_Oryza_2 AAGTGGTTTATATTTTGGAGGAATATAACATGGATTTCATCTTAATCACTCGTCTAGGC 540
UceAl.7
A-Tubulin_Coffea_2
35Sd_AMV

15 Arabidopsis
Uce_Oryza_3
Gos-2_Zea
Uce_Oryza_1
A-Tubulin_Coffea_1 ATTATATGGATCTGGTCCAGCGTGAATGCAGTTGTAGTAAAGACATGTTGGATTGTTAT 550
20 Uce_Oryza_4
UBI9_Saccharum
Enolase_Zea
Actin-2_Zea
Uce_Oryza_2 AGTATGTGTATTTCATGATGGATATGGTACTATACTACGGAGTTTTTTCTTCACAAAATAA 600
25 UceAl.7
A-Tubulin_Coffea_2 AGTGAAGTAGCAGAGATAATAG 22
35Sd_AMV

30 Arabidopsis
Uce_Oryza_3
Gos-2_Zea
Uce_Oryza_1
A-Tubulin_Coffea_1 GGATCAAACACTACTACTAGTAGGGAAATGCTTCAAAGACTTCTCTGTGATTTTCTCCAG 616
Uce_Oryza_4
35 UBI9_Saccharum GAATTCGGCGTGGGCGCTGGGCTAGTGTCCCGCAGCGA 40
Enolase_Zea
Actin-2_Zea
Uce_Oryza_2 CCTGTTATTTGACCTCCAACCAACACGAATTATACCAAAAATTTGGGTTATTTCATCTA 660
25 UceAl.7 TTATTACAGTAGCAGTAATAAAAATAAAATACATTTTATTACAAAAAACGTACAAGAGGT 82
A-Tubulin_Coffea_2
40 35Sd_AMV

45 Arabidopsis
Uce_Oryza_3
Gos-2_Zea
Uce_Oryza_1
A-Tubulin_Coffea_1 CCGAATGGTCCAAGTACACTAGCAAAAAGAAGCACAAACGGTACCAATGACTCGAGCGAGC 676
Uce_Oryza_4
50 UBI9_Saccharum GCGATCTGAGAGAACGGTAGAGTTCCGGCCGGGCGCGGGGAGAGGAGGAGGTTCCGGCG 100
Enolase_Zea
Actin-2_Zea
Uce_Oryza_2 TAGTACAACCTATTATAAACATGCAGTAAATTATCCTACACATATACCAAAAATTCAAGT 720
25 UceAl.7 CCGCGAAGATAGCCAATGAGAACGCAAGAAGACAACCCAATTCT-CCTATTTTATTATTA 141
A-Tubulin_Coffea_2
55 35Sd_AMV

60 Arabidopsis
Uce_Oryza_3
Gos-2_Zea
Uce_Oryza_1
A-Tubulin_Coffea_1 TGACATTTTGGGCTTCAGATTAGCACAAAGACAAAAGGATTTTTCACCTTTTCTTCTGTAGG 736
Uce_Oryza_4
UBI9_Saccharum GGGAGGATCCGATGGCCGGGAACGAGTGGATCAATGGGTACCTGGAGGCGATCCTCGACA 160
Enolase_Zea
Actin-2_Zea
65 Uce_Oryza_2 GTAATAATCCTAATACACAGACTTAAAAATCAAACCTATTTCTTTTAAAGATATGGAAAA 780
UceAl.7 AATATTTCTAGAAGAAAGGTAATACGCCCCACGGTCAAAAACCTATTAATAAGATCA 201
A-Tubulin_Coffea_2 CATTCTTGCCAGAAAGCACTAGTGAATATTCTATCCCTGTCTAG 44
35Sd_AMV

70 Arabidopsis



	Uce Oryza_3	
	Gos-2_Zea	
	Uce Oryza_1GTCGACTTGATGATTTATTTTCCTTGATCAATGATTTTCCTTC	49
5	A-Tubulin_Coffea_1	TGATCCTCGACTCGCAGCTTGGCATGCTCAATTCAGGAGCTTTTGAGATITGGATAGGGTG	13
	Uce Oryza_4	
	UBI9_Saccharum	GCACACCTCGTCCGGGGTGGCCGGCCGGCCGGCCGGGGGGGACCCAGGTCCGGGA	22
	Enolase_Zea	
	Actin-2_Zea	
	Uce Oryza_2	CCATTTTTTAAACGGAAGGAAACAAATTCGGGTCAAGGGGAAAGCCAGCGGCCACCC	84
10	UceA1.7	TATATTTATCACTCAACTTCCAAAAGTTACAAAATGATATTAACACTATTCAAAAAGTTT	262
	A-Tubulin_Coffea_2	TCATATAGATTTCTGGAAGTCCATGTAATCTAAAAATCTTTCCAGGAAGAGTTGAGCCAC	104
	35Sd_AMV	
	Arabidopsis-GTGTTTCATTTGATAGAGTCTAAAAATCACCACCTTACATTGACTAACC	50
15	Uce Oryza_3	
	Gos-2_Zea	
	Uce Oryza_1	TGGCTATTTGATTTTTTGAAGGATATTTTTTTCCTCGGAAGACACCTATGGGAGCGAAGA	39
	A-Tubulin_Coffea_1	TTGTTATGAATCCACCCGAGGTTGGCATGCTCAATTCAGAGCCCTTCACATGTAACCGTG	35
	Uce Oryza_4	
20	UBI9_Saccharum	CGAAGGCGCGGAGCCCCCGCGGCGCCACATGAACTTCAAACCCCTCGCACTACTTCGT	279
	Enolase_Zea	
	Actin-2_Zea	
	Uce Oryza_2	ACGTCAGCGAATACGGAGGCGCGGGTTGACGGCGTCACCCGGTCTAACGGCGACCAAC	900
	UceA1.7	ATTTCAAGTCATTTGGATTGTTAAAAATAGCATTGTATGGATTTCCCTGTTACATTGCCT	321
25	A-Tubulin_Coffea_2	CTGTTTGGTTGTGAAGGGGTGAGCTAAGCAAGCAAATGACCTACTTTGGACACCTATC	164
	35Sd_AMV	
	Arabidopsis	AAATTTGTCTAAACACTAATCAATCCGAAGATTATAAAAATGTCGACAAAGAAAATAAAA	110
30	Uce Oryza_3	
	Gos-2_Zea	
	Uce Oryza_1	TATTATGTTA	159
	A-Tubulin_Coffea_1	TGTAGCCCAGGCCCAAATGCCCGGAAYTTTAAACTGAAATCTCGGAAYAGCAGATGGCA	916
	Uce Oryza_4	
35	UBI9_Saccharum	GAGGAGGTGGTCAAGGGCGTCCAGCAGAGCGACCTCCACCCGGACGTGGATCAAGTTCGT	339
	Enolase_ZeaTCATATATTTATG	13
	Actin-2_ZeaTCAGT	5
	Uce Oryza_2	AAACCAGCCAGAAGAAATACAGTAAAAAAAAGTAAATGACACTTTGACCACCTTTTAT	960
	UceA1.7	ACATCAATCGAAGCCTCTCATTCCCCTCTTTTTTATAGATTAAGTTTTTTTTTATAAAA	381
	A-Tubulin_Coffea_2	AATCACGTATTATATCCTTGAGATCTGGAAGGCTCTCTATGAAGTCCATGGTTAGGTGA	224
40	35Sd_AMVGGTCCGATCTGAG	13
	Arabidopsis	TAAAATAGGAGTCTATGAGTCGATGGAACCTTATCCAACATAAATTTAATAAGAATGAACC	170
45	Uce Oryza_3	
	Gos-2_Zea	
	Uce Oryza_1	TATATATCACATCAGTCTCTGCACAAAGTGCATCCTGGGCTGCTTCAATTTATAAGCCCC	219
	A-Tubulin_Coffea_1	ACGGTCGTAATTCGTCAAGCAATCCGAAACGTCGCCACACCCCCACCCAGCTGGAAAAT	976
	Uce Oryza_4AAGCTTGCTGTCTCTACTAGATACCAGGGTTTC	34
	UBI9_Saccharum	GCCACCCGCAACGCCCGGAGCGCAGCACCAGGCTCGAGAACATGTGCTGGCCGATCTGG	399
50	Enolase_Zea	AACGGAGATAGTGCATCTATCATGCGATCTTCGACGGAGTCGACGTCGATTGGACCAG	73
	Actin-2_Zea	ATGATTGCTTTCAATATAGGCTGATGGAGCCTATGAATGATCTATAACTATGTGATTGGA	65
	Uce Oryza_2	TACCCAAAGTTTCAATTTGGACCACCTTAAACCTATCTTTTCAATTTGGCCCGGTTGT	1020
	UceA1.7	CAATTTTAAACATCATGAATCTCTGAACATAAAATTTAAATAACTTTTTTCTTCGATCTTT	441
	A-Tubulin_Coffea_2	GTCCAAGCTAAACGAGGAATAGTGTGATGGTTGTAGCAGTCCAAGGTAGGGTCCATGCTTT	284
55	35Sd_AMV	ACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGATTCCATTGCCAGCTATCTGT	73
	Arabidopsis	AAACTCAATTTT--GTAATAATATTTAAAAATACGTT--TTTACTCTCTCCAGAA--AT	222
60	Uce Oryza_3	
	Gos-2_ZeaATTATTGGCTGTAGGAT--TCTAAACCAGCCTAA--AT	35
	Uce Oryza_1	ATTCACCACATT--TGCGAGATAGTCGAAAAGCACCA--TCAATATTGAGCTTCAGGTAT	275
	A-Tubulin_Coffea_1	CAGTTCAAAATT--CAAATTCATTTGGAGCCGTTCC--AAACAAAATTGTTTCAGTTTT	1032
	Uce Oryza_4	ATCTTTGGTTTT--GGTCATTTGGACCAGGGTGCCTG--AAATATCGAAATTTTCAGAAAT	90
	UBI9_Saccharum	CACCTCGCGCGCAAGAAGAAGCAGCTGGAGCTGGAGG--GCATCCAGAGAATCTCGGCCAA	457
	Enolase_Zea	AAATTCAGATGGTGAGCAAAAGTGCCACTTGCCCTGCC--TCCTTTCTGGTGCCTGACCT	131
	Actin-2_Zea	TGCTTAACTTGCGTAGCCAAGCTCGTATGAGCCTCT--TTTACTGGGTACCCTGATTT	123
65	Uce Oryza_2	GGTTTGGACTACCATGAACAACCTTTTCGTATGCTCTAACTTCCTTTTCGGCAACATATG	1080
	UceA1.7	GACATTGAATGTTAAATTAACCTGAATCTAAGGTATG--TTCCTACTTGTGATAAATACAG	500
	A-Tubulin_Coffea_2	GACTTAAATCTTTGGCATATGTCACAAGCATGAATATACCTGATGATTTCCCCAAAATGT	344
	35Sd_AMV	CACCTCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGAT	133
70	Arabidopsis	ATCCCATCTCTGATTCCAATTCCTCCTCTCTCTCT--TTCGTCTCTCTAC--	272



	Uce_Oryza_3	TTATTTTTATGGGATA --TTAGT T TCGSRGUGG--CTAATTTTCCCTG CCGAT	
	Gos 2_Zea	TAGCACAGAGGGGACA --CTAGA -----AATGAC-TTGCCTGACTTAGAGTATCAG	349
	Uce_Oryza_1	CACGGCAGTAACCCGC --TTTGCCTGGGTGTTAACGG CCACCAACCCCGCCTTGGACGA	607
5	A-Tubulin_Coffea_1	TTGGTCAAGGCGGTAT --CCAGGTGCGGAAATGCTG--CTGGGAGCTCTACTGCTCGA	1366
	Uce_Oryza_4	TCACGTAGCGCAAATG--CCGCTCCCGTTTCCGCATC-GTGGGATTTATCTCTTTTCTG	425
	UBI9_Saccharum	ACTTGC'AAGAGCGATG--TCAATGATGCCTGGAGTGT-ACAGGGTGGACCTTTTCACTC	763
	Enolase_Zea	TAATTTTGGTGGTGT--TTGGCTGGCTAGCTACCA--TTACCTTCTGCATTTAGACAT	464
	Actin_2_Zea	TGAGTTTTTCAAGCCT ATAGATTTTCTATTGTCT TTTTAATTAAC'TTCTCCCA	459
10	Uce_Oryza_2	CCATTTGACACGTGGGA --GTGAATTTGTTAGAGGGAA-AT CTTGCCACAACTGTGGCT	1421
	UceA1.7	TAAACAAAATAAAAAT TAGUC'AGGACAGGAGGAT-CTCTAGCTACTTTTTCTCTC	545
	A-Tubulin_Coffea_2	TAATTAAGCCGAAGTC--CTAACGGCATGGCGAACGG-CCGAGGTGGTCGGAGCCTAAG	699
	35Sd_AMV	CAGTGGTCCCAAAGATGGACCC'ACCCACGAGGAGCA TCGTGGAAAAAGAAGACGTT'	489
15	Arabidopsis	TTTCTGGGTTGGGTTTCTAAATTTGTTGGT-CTAAGAACAGTGAAAT-	588
	Uce_Oryza_3	ATATAAGAGCGGGT'GACCACGACTGC -- GGCGCGCGCA----- CCACTC	318
	Gos 2_Zea	ATA AACATCATGTTTACTTAACTTTAAAT TTTTATCGGTTTCTAC---	401
	Uce_Oryza_1	A-ACGGCATCAGCTT'CCACCTCTTCGATA-TCTCCGCGCGCGCTC---	660
	A-Tubulin_Coffea_1	GCACGGCATCCAGG'FAAATTGCTTCTATC-TAACCTCTTATATITC----	1420
20	Uce_Oryza_4	TTTCCGAATTTTATPAGTAGTGTGATATTTAATACAGGCTCTGT---	48-
	UBI9_Saccharum	GTCAATGTGCATCT'GTGACGTGGAGCTGGAGCTACGGTGGCCAAACC	549
	Enolase_Zea	TACAAATTTACAATAAATAAAGTTCCTAGATTTTGAACGAAACCAGC----	519
	Actin-2_Zea	GCCGGGATGCGCGTATAAAAACCGCGGAAACCC'TGGCTCTCCTCATT---	515
	Uce_Oryza_2	ACAACCAACACACTGTCAAATTTGCC'AACTTAGGCGTGGCAAACCTG---	1477
	UceA1.7	A---AAATTTCTCCAATTAGCTTGAATTTTCTATT'TGTTTCTCTT---	897
25	A-Tubulin_Coffea_2	AGACATAGGCGGGACCCAGCTCTGCCGACCTGGAATACCCTCTCA---	752
	35Sd_AMV	CAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG	549
30	Arabidopsis	CAGTGATC--CCAGATTCT-ACACTCT-AAATTTGTTGGTCTAA-GAA-----C	632
	Uce_Oryza_3	CACCACCA--CCA---CCA-CCACTCC-A--CCGATCGGCGAGA-GCG-----C	357
	Gos-2_Zea	TAATATTT--TTGTCTCTATAGTACT-ACGTGCAACAGTATAA-TCAA---	450
	Uce_Oryza_1	CCCCCTTT--CCGTFCTTTCTTCTCT-TCCTCGGTTTGGCTGG-TGGGACCGACTCCC	716
	A-Tubulin_Coffea_1	TGTTTCTC--TCATTTTTGTTCAAGGA-AATGATTCTCTTTGG-TTTGATTTGGGTTG	1476
	Uce_Oryza_4	CGTCTCCT--CCTCCCTTATATAAAGG-CAGCGTTTCTGCAAGT-TATTACCAACTCTAC	539
	UBI9_Saccharum	TGCCCGCG--TTCCAATGATGGAGAGG-GGATGGGTGAGAGTGG-CGGAGCCTACATTGT	905
35	Enolase_Zea	CACCGTCC--TTG-CCCCACGGAACAA-GAAAAATGGAATATGC-TCCCGCAGCCCTCGT	574
	Actin-2_Zea	CACAACCG--CTT-ACTCTCGTGGCT-CTCCGTGGGAGCGAGG-ACCCGCGGCG--GC	568
	Uce_Oryza_2	TGTGGCTT--ACAACCAAACACACCCTTAGATAATAAAATGTGG-TCCAAAGCGTAATTC	1534
	UceA1.7	ATTTTTTT--TGGTCCGTGTTAATCTTCTGTTGAAGGCGATCTAGCTTTGATTTGAATTC	955
40	A-Tubulin_Coffea_2	TACTAGTTAGTAGTACCACCTGCTACTGCTTCAGTTCCTTTTATCACTTGCTTTACATGA	812
	35Sd_AMV	CACAATCCCACCTATCCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGG	609
45	Arabidopsis	A-GTGAAATGTTGTTTTCAGT-GATCCAG-----	660
	Uce_Oryza_3	G-GGGAGATCGTT-CGACGGC-GCCAAGATGC-----	386
	Gos-2_Zea	T-ATAATATTTTTGTCTCTATAGATACTACG-----	480
	Uce_Oryza_1	C-AAACCGCCTCTCCCTCTCTTTATTTGCTATATTCTCACTGGGCCCCACCACCGCAC	775
	A-Tubulin_Coffea_1	T-GTGAATAGCCTGATGGACAATGCCGAGCGACCACACCGTCGGAGGCGGAGACGACG	1535
	Uce_Oryza_4	ACGAGAGAGAGATCGTTCGACGATATAGAGAGAGAGAGATAGGGCAAGATGC-----	594
	UBI9_Saccharum	CGCATACCGTGTGGGCCCGGATAAATACCCTCAAGAAGGAAGCGTTGTGGCCCTACCT	965
50	Enolase_Zea	GGAAACCAAGGGCGGACCTTCCCTC-----	600
	Actin_2_Zea	GGCAGCGGCAGCTTCTCTAGATCTCCGGCATCATCAGTGGATCC-----	613
	Uce_Oryza_2	ACTAAAAAAAAT-CAACGAGACGTGTACCAACCGGAGCAACCGGCATCTTCTCGAAAT	1593
	UceA1.7	ATTTTTTTCTTTTTCCTTTTAAAGATACTTTTGTGTTGTTTTAGGGTTTAGGCGATGG	1015
	A-Tubulin_Coffea_2	ATTAAGTCGATGCTCTTCTTGAATAACTAGCGATTAGTTTCGTGGTGACCTATCTAGCC	872
55	35Sd_AMV	AGAGGAGATCTTTTATTTTTAATTTTCTTCAAATACTTCCAC-----	653
60	Arabidopsis	-----	
	Uce_Oryza_3	-----	
	Gos-2_Zea	-----	
	Uce_Oryza_1	CCCTGGGCCCCTCACGAGTCCCCCCTCCCGACCT---	811
	A-Tubulin_Coffea_1	CTTTCAACACCTTCTTCAAGCAAACCGGAGCCGGCAAACACGTTCTCTGTCGGTGTTCG	1595
	Uce_Oryza_4	-----	
	UBI9_Saccharum	CCAAGAGTTTGTGATGGAGCCCTTGGCATA'CTCTGAACATG'CCAAGGCTCTGGGAGA	1025
	Enolase_Zea	-----	
	Actin_2_Zea	-----	
65	Uce_Oryza_2	TTCCCAACCGCTGGCTGGCCCGCTCTGCTTCCCGGAAACCGGTTGGTTT'GAGGCTGGC	1653
	UceA1.7	CTTCAAAGCGGATCTTGAAGGAGCTCAAGGACCT-----	1049
	A-Tubulin_Coffea_2	ATTTTTCTGTTTGGGTTGGCATCAATCCTGAACACAGAAAGCTGCAAG-----	919
	35Sd_AMV	-----	
70	Arabidopsis	-----	

Exemplo 3

Clonagem da seqüência promotora uceA1.7, do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de algodão em vetor de plantas (pCAMBIA1391).

O DNA da bactéria transformada contendo o vetor recombinante, ou seja, o
5 promotor UCE de algodão clonado no vetor pGEM-T, foi digerido com as enzimas de
restrição *Nco* I e *Spe*. Em geral, foram utilizados 5U de enzima para cada µg de DNA,
no tampão OPA (One-Phor-All) da pharmacia biotech numa concentração final de 2x, a
37 °C por 3 horas. As enzimas não cortam o inserto, mas flanqueiam o sitio de
clonagem no vetor, e o inserto de 1.0 kb purificado com o kit Gene Clean (Bio 101
10 Systema). O vetor pCAMBIA1391 (Figura 3) foi digerido com *Nco* I e *Spe* I e
purificado com o kit Gene Clean (Bio 101 Systema). O inserto de 1.0 kb foi ligado ao
vetor pCAMBIA1391 com T4 DNA ligase (Figura 3). A concentração de DNA (vetor
Pcambia: promotor uceA1.7) utilizadas no sistema de ligação foi efetuada através de
uma razão molar de 1:3. A reação de ligação foi realizada em tampão ligase 1x
-15 contendo 5U de T4 DNA ligase. O vetor recombinante contendo o polinucleotídeo da
presente invenção foi usado para transformar células competentes de *E. coli* por
eletroporação (Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-
SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 101. p.). De um total de aproximadamente 400
clones de bactérias transformadas, oito foram selecionados e analisados por PCR, com
20 os primers W4 e UCE2, para verificar a presença do inserto. Os clones 1, 6, 7 e 8 foram
positivos, conforme mostra a Figura 4. Para confirmar a clonagem e a orientação do
inserto, o DNA plasmidial dos clones 1 e 7 foi obtido por preparação de DNA
plasmidial em pequena escala com o kit miniprep 250 (Quiagen) e digerido com *Hind*
III e *Xba* I. Em geral, foram utilizados 5U de enzima para cada µg de DNA, no tampão
25 OPA (One-Phor-All) da pharmacia biotech numa concentração final de 1x, à 37 °C por
3 horas. *Hind* III não corta o inserto, mas está presente no polilinker do vetor e *Xba* I
corta o inserto na posição 148. Ambos os clones foram confirmados como positivos
conforme mostra a Figura 5. O vetor pCAMBIA1391 foi selecionado para que o
fragmento correspondente a extremidade 5' do gene UCE presente no clone uceA1.7
30 (uceA refere-se a Ubiquitin conjugating enzyme de algodão; o 1.7 refere-se ao número
dos clones positivos obtidos em cada etapa de clonagem. O 1 corresponde ao clone
número 1 da amplificação do promotor e o 7 ao clone número 7 da clonagem do clone 1

no vetor pCAMBIA1391.) fosse clonado em fase com a região codificadora do gene *gusA* presente no vetor.

Exemplo 4

5 *Caracterização funcional da seqüência de DNA promotora do gene da proteína de conjugação à ubiquitina de algodão – uceA1.7.*

Para validar o potencial da seqüência de DNA isolada, o vetor contendo a seqüência promotora SEQ ID NO1 foi introduzido em células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 por choque térmico. Para essa transformação foi adicionado 1 µg de DNA plasmidial (vetor pCAMBIA 1391, contendo o promotor da presente invenção) em 100 µL de suspensão de célula competente de *A. tumefaciens* LBA 4404, a reação foi então incubada no gelo por 30 minutos. As células permaneceram em nitrogênio líquido até a solidificação, e foram transferidas imediatamente para 37°C para então serem incubadas por 5 minutos. Foi adicionado à reação 1 mL de meio YEB (5g de Extrato de Carne, 1g de Extrato de levedura, 5g de Peptona, 5g de Sacarose e 240mg de MgSO₄, completar o volume com água deionizada para 1 litro e ajustar o pH do meio para 6,8), e as células ficaram incubadas por 2 horas a 28°C. A solução foi plaqueada em meio YEB sólido (Meio YEB acrescido de ágar 1,6% p/v). Foi selecionada uma colônia positiva, crescida no meio YEB com o antibiótico de seleção (canamicina). Essas células transformadas foram utilizadas para a transformação de plantas de *A. thaliana*-
20 *Columbia* pela técnica de infiltração de botões florais. Esta técnica consiste no encharcamento de botões florais de *A. thaliana* com uma cultura de *Agrobacterium* contendo 50 g/L (w/v) sacarose e 300 µL/L Silwet L-77. Para tal, as plantas de *A. thaliana* foram submersas de ponta-cabeça, por cinco minutos, na cultura de *Agrobacterium* transformada com o vetor recombinante da presente invenção, de forma
25 a atingir apenas os botões florais. Em seguida, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação até a coleta de sementes.

As sementes coletadas foram desinfestadas em álcool 70%, por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e lavadas 4 vezes com água estéril. Em seguida, foram semeadas em meio de cultura MS (murashige, T. & skoog, F. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, 1962) contendo higromicina na concentração de 20 µg/ml, visando a seleção de transformantes (Anexo 1a). As plântulas germinadas e enraizadas foram transferidas para copos com terra estéril e cobertas de forma a preservar a umidade, e transferidas para casa de vegetação (Anexo 1b).

Após algumas semanas, dependendo do desenvolvimento das plantas aclimatadas, cortes de raízes, caules, folhas e botões florais foram realizados e os mesmo foram incubados em solução de X-gluco preparado de acordo com Brasileiro & Carneiro (Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 131. p.), com o objetivo de verificar a indução da expressão do gene *gus*.

O vetor recombinante contendo o promotor CaMV35S (Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter) duplicado com a seqüência enhancer do AMV (Alfafa Mosaic Virus) (CaMV35SdAMV) foi capaz de promover a expressão do gene *gus*, nas (a) folhas, (b) Caule, (c) raiz e (d) botão floral em *A.thaliana* (Anexo 2 A-D), como o esperado, já que esse promotor tem sido descrito na literatura científica como um forte promotor constitutivo. Assim quando comparamos a presente invenção que contém a construção sense do promotor de algodão uceA1.7 com CaMV35SdAMV observar-se que o promotor U uceA1.7 é uma excelente ferramenta biotecnológica, já que esse promotor também possui uma forte expressão constitutiva promovendo uma grande atividade enzimática da β -glucoronidase, (e) nas folhas, (f) caule, (g) raízes e (h) botão floral de *A. thaliana*, (Anexo 2 E-H).

A estratégia utilizada na presente invenção para a caracterização funcional das seqüências de DNA, previamente isoladas do algodão, foi eficiente para se avaliar o potencial desta seqüência. Os resultados obtidos mostram que a seqüência uceA1.7 é capaz de direcionar a expressão de β -glucoronidase em níveis elevados, representando, assim, uma seqüência reguladora com potencial uso constitutivo na produção de plantas geneticamente modificadas.

Com o intuito de se determinar quantitativamente a expressão dirigida pela seqüência de DNA em estudo, foi realizado um ensaio fluorimétrico da atividade específica da enzima β -glucoronidase usando extratos protéicos das plantas de *Arabidopsis* contendo construções (vetores recombinantes) com promotor CaMV35S (controle positivo) e o promotor do algodão uceA1. 7. Para tal, os extratos protéicos (foram obtidos de acordo com o Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 133. p). Foram quantificados pelo método de Bradford (foram obtidos de acordo com o Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 255. p) e submetidos ao substrato MUG (methyl-umbelliferone-glucoronide) 2mM e, após 30

minutos de reação à 37°C, a atividade fluorimétrica da reação foi determinada através do ensaio espectrofotométrico. O cálculo da atividade específica do GUS foi realizado de acordo com Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 136. p (Figura 6).

- 5 Pode-se observar que a seqüência de DNA contendo a região promotora uceA 1.7 é capaz de dirigir a expressão de GUS em folhas em níveis similares ao promotor de plantas comercial mais forte e utilizado atualmente (CaMV35S duplicado com o *enhancer* do AMV). Além disso, a expressão dirigida por este fragmento em caule e, principalmente em botões florais de plantas de *A. thaliana* é consideravelmente superior
- 10 àquela do promotor CaMV35Sd+AMV, tornando o promotor da presente invenção mais adequado para produção de plantas transgênicas expressando genes de interesse nesses tecidos vegetais.
- 156

REIVINDICAÇÕES

1. Um gene quimérico compreendendo um polinucleotídeo com atividade constitutiva caracterizado por o dito polinucleotídeo ser definido pela SEQ ID N°01, opcionalmente ligado: (i) a sequências acentuadoras de expressão, ou (ii) promotores de interesse, ou (iii) a uma sequência de polinucleotídeo de interesse, sendo pelo menos uma das opções de ligação uma sequência heteróloga.
2. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse poder ser uma região de codificação ou uma região de não codificação.
3. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da região de codificação ser isolada de um gene endógeno ou heterólogo, sendo o gene endógeno ligado a pelo menos uma sequência heteróloga.
4. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse poder estar na orientação sense ou antisense.
5. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato das sequências acentuadoras de expressão serem selecionadas do grupo consistindo de SV40, HSV-1, AMV, HPV-16, entre outros.
6. Um vetor recombinante caracterizado por conter um gene quimérico de acordo com a reivindicação 1 a 5.
7. Um vetor recombinante caracterizado por compreender:
 - a. A SEQ ID N°01, opcionalmente ligada a sequências acentuadoras de expressão ou promotores de interesse; operacionalmente ligados a
 - b. Uma sequência de polinucleotídeo de interesse; e
 - c. Uma sequência de terminação;sendo pelo menos uma dessas sequências uma sequência heteróloga.
8. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse poder ser uma região de codificação ou uma região de não codificação.
9. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse ser isolada de um gene endógeno ou

heterólogo, sendo o dito gene endógeno ligado a pelo menos uma sequência heteróloga.

10. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato da sequência de terminação ser selecionada do grupo consistindo de sinal de terminação SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene trpC de *Aspergillus nidulans* e outros semelhantes.
11. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 7 caracterizado pelo fato das sequências acenturadoras de expressão serem selecionadas do grupo consistindo de SV40, HSV-1, AMV, HPV-16, entre outros.
12. Método para modificar a expressão de genes em um organismo caracterizado por incorporar estavelmente no genoma do organismo um vetor recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 11 ou um gene quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5.
13. Método de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato do organismo ser uma planta.
14. Método para produzir uma planta tendo a expressão de um gene modificada caracterizada pelo fato de compreender as seguintes etapas:
 - a. Transformar uma célula de planta, tecido órgão ou embrião um vetor recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 11 ou um gene quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5;
 - b. Selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
 - c. Regenerar plantas maduras de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionadas na etapa (b);
 - d. Selecionar plantas maduras da etapa (c) tendo a expressão do gene modificada quando comparada com uma planta não transformada.

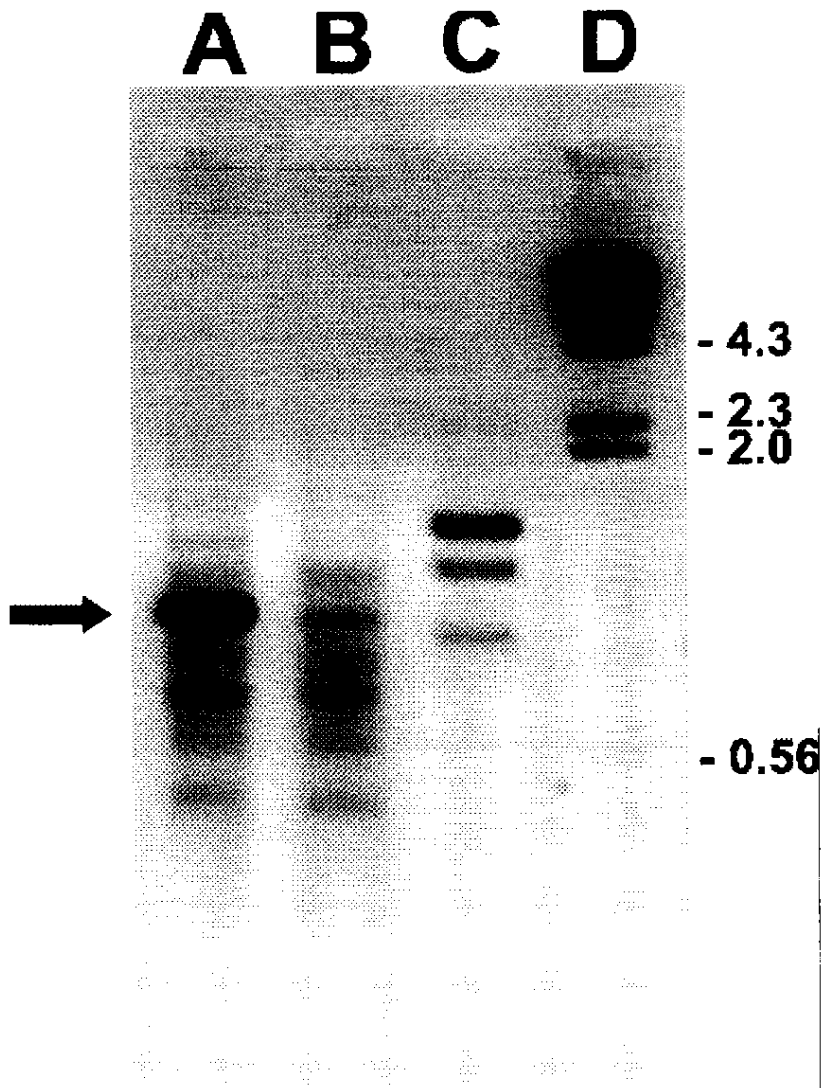


FIGURA 1

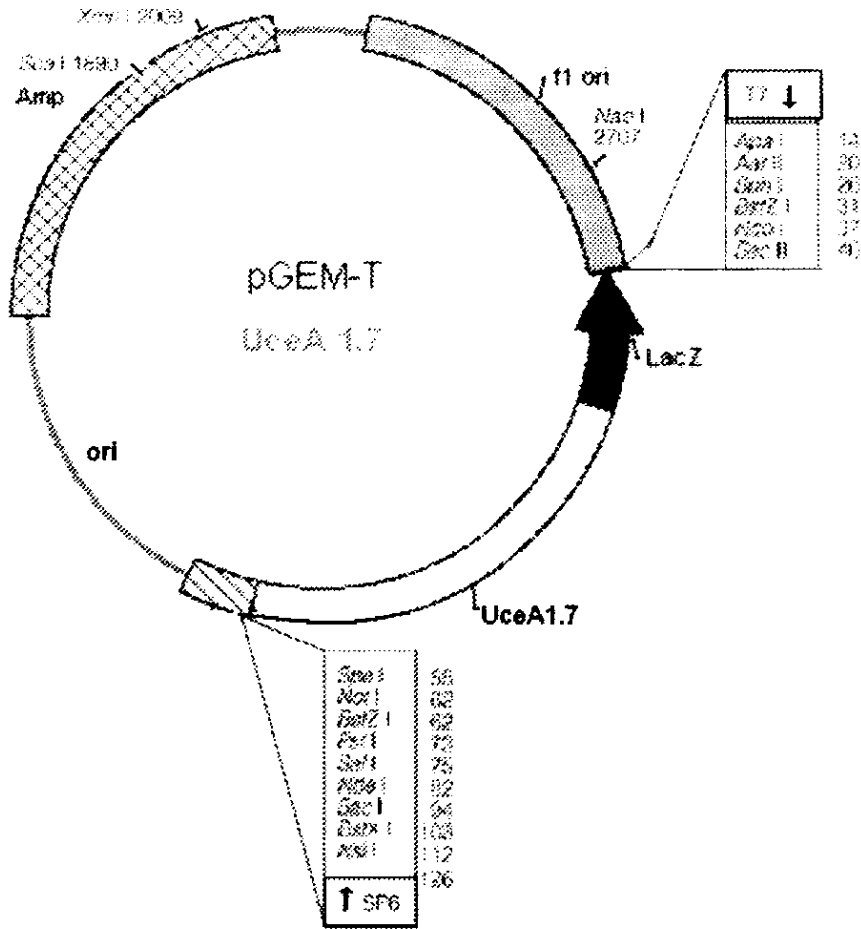


FIGURA 2

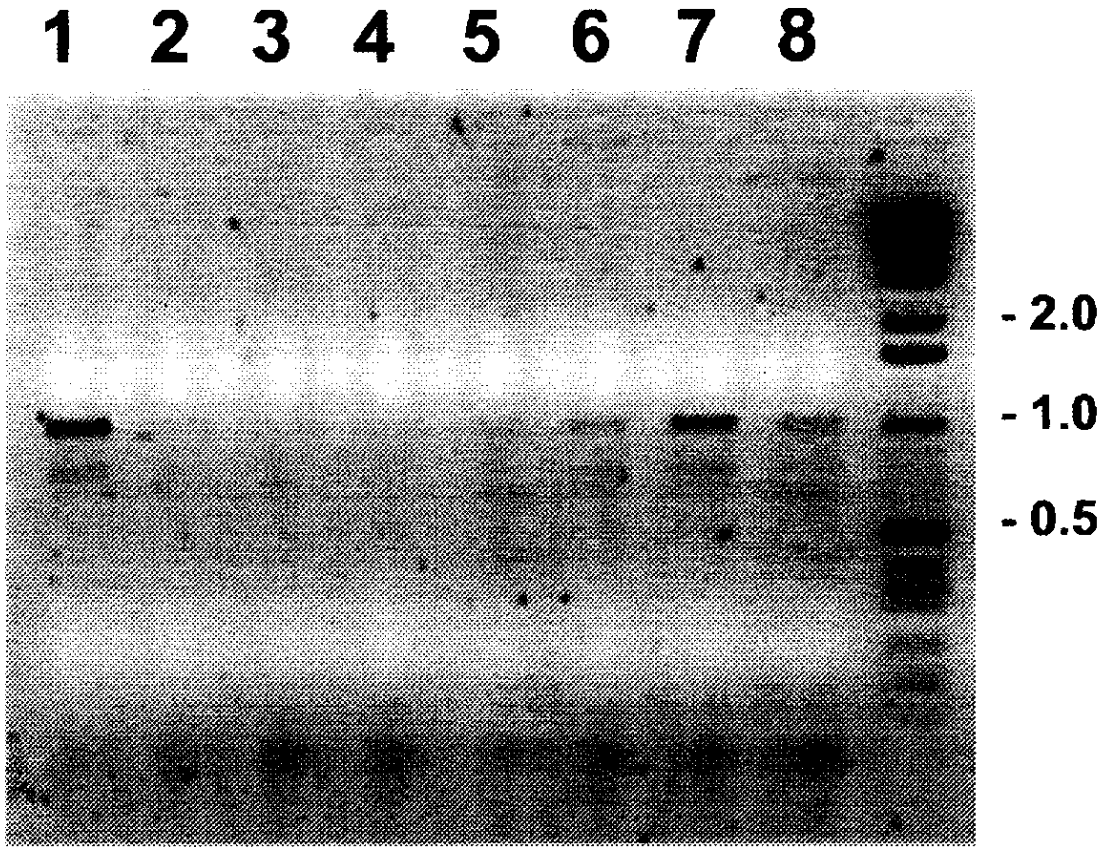


FIGURA 4

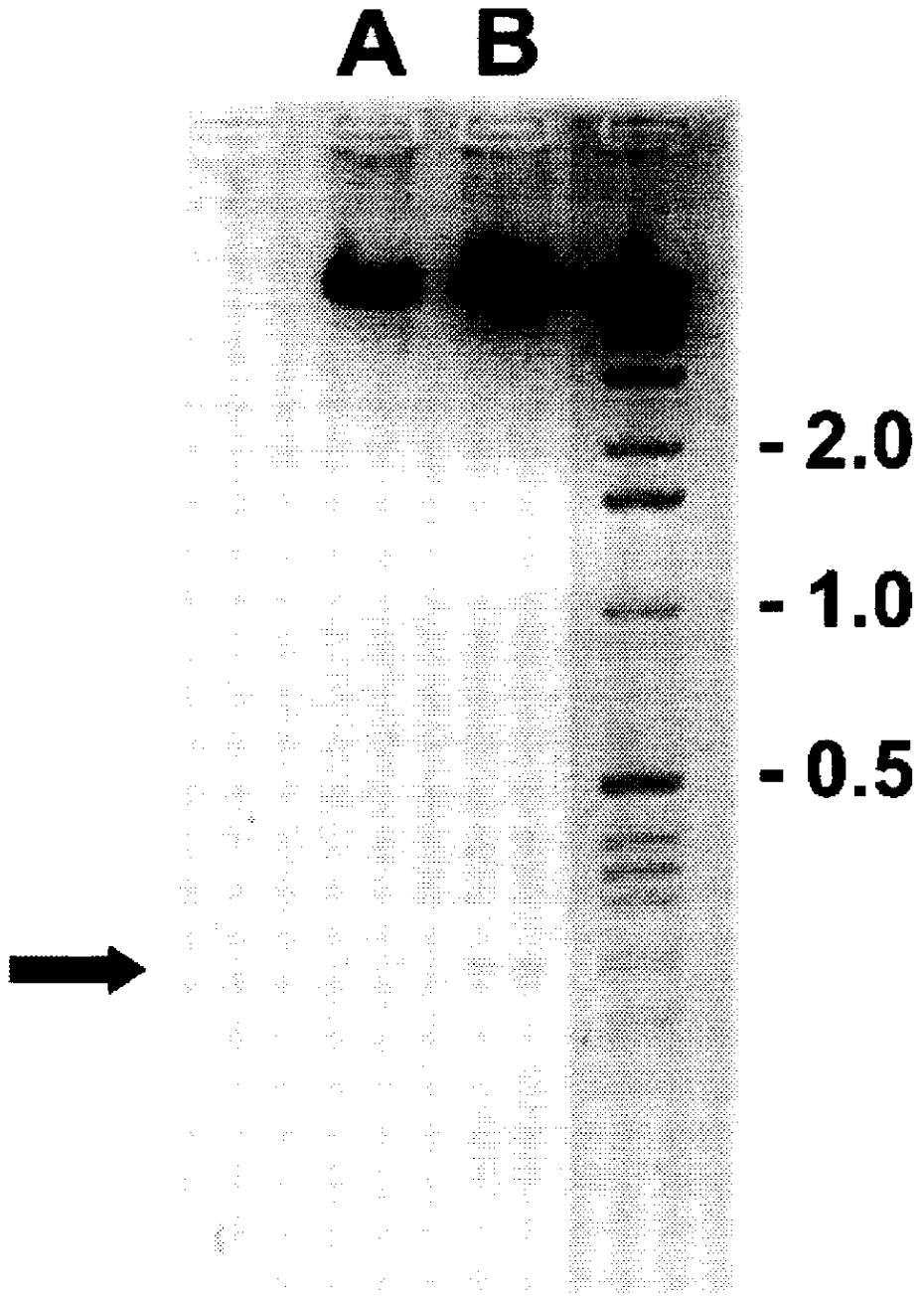


FIGURA 5

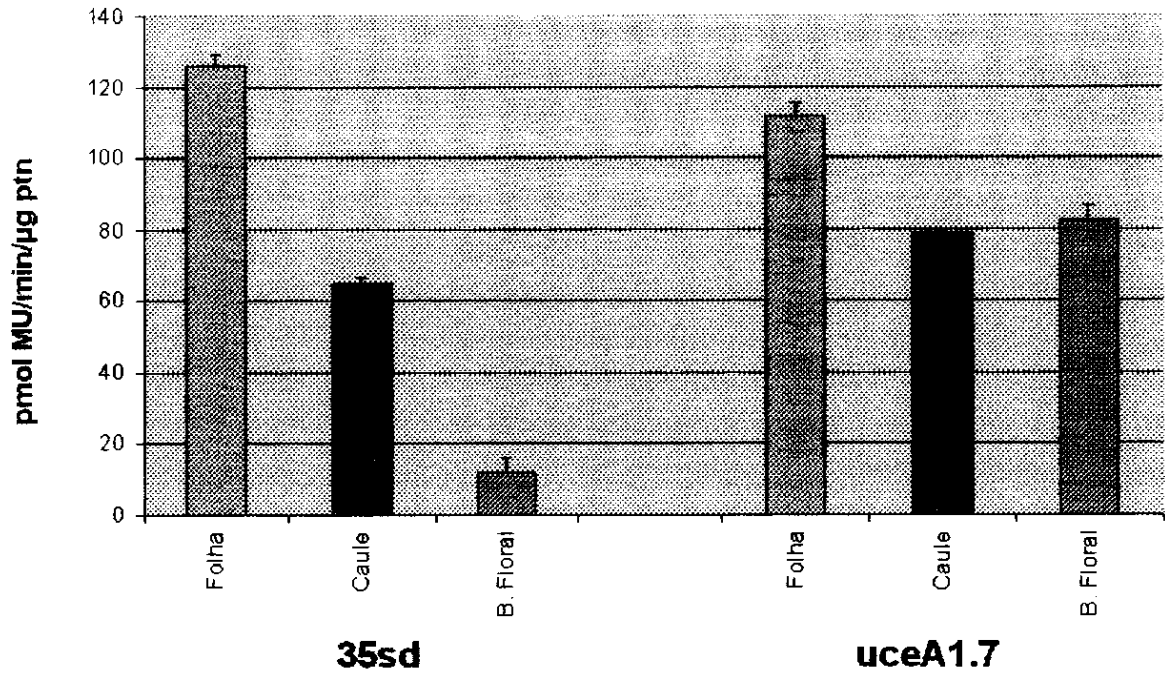


FIGURA 6