





PI0806404-0

“PLANTA QUE COMPREENDE NO SEU GENOMA UMA CONSTRUÇÃO DE  
DNA RECOMBINANTE, PLANTA, MÉTODOS DE ALTERAÇÃO DA  
ARQUITETURA DE RAIZ EM PLANTAS, MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA  
ARQUITETURA DE RAIZ EM PLANTAS, MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO  
5 DE ALTERAÇÕES DE UMA CARACTERÍSTICA AGRONÔMICA EM  
PLANTAS, POLINUCLEOTÍDEOS ISOLADOS E FRAGMENTOS DE ÁCIDO  
NUCLEICO ISOLADO”

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições e métodos úteis na  
10 alteração da arquitetura de raiz em plantas. Além disso, a presente invenção  
refere-se a plantas que tenham sido transformadas geneticamente com as  
composições de acordo com a presente invenção.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Sabe-se relativamente pouco sobre a regulação genética da  
15 função e desenvolvimento das raízes de plantas. A elucidação da regulação  
genética é importante, pois as raízes atendem a funções importantes tais como  
a obtenção de água e nutrientes e a fixação das plantas no solo.

A arquitetura das raízes de milho é composta de diferentes tipos  
de raízes formadas em diferentes etapas do desenvolvimento da planta. Uma  
20 série de mutantes afetados em tipos específicos de raízes durante diferentes  
etapas de desenvolvimento foi descrita em milho (tais como *rtcs* (sem raízes  
com relação a raízes coroa e seminais), *lrt1* (sem raízes laterais 1)). O mutante  
*rum1 recessivo monogênico* (sem raízes com meristemas não detectáveis 1) foi  
relatado em primeiro lugar por Woll et al (2004), *Maize Genetics Cooperation*  
25 *Newsletter* 78: 59-60. Uma descrição mais detalhada do fenótipo mutante foi  
publicada por Woll et al (2005), *Plant Physiology* 139 (3): 1255-1267.  
Demonstrou-se que o mutante de milho tem impedida a formação de raízes  
laterais e seminais sobre a raiz primária. Nenhuma diferença óbvia foi

detectável em desenvolvimento aéreo entre *rum1* e plantas do tipo selvagem. Análise genética da mutação *rum1* indicou que ela é herdada como uma característica recessiva monogênica. A introdução da mutação *rum1* em diferentes antecedentes genéticos resultou, entretanto, em razões de  
5 segregação que sugeriram a presença de um supressor recessivo da mutação *rum1* nesses antecedentes.

O hormônio vegetal auxina desempenha um papel fundamental durante a embriogênese e está envolvido em diversos aspectos do desenvolvimento de raízes. No mutante *rum1*, o transporte de auxina em  
10 direção à extremidade da raiz é severamente reduzido. Mutações em membros das famílias genéticas *Aux/IAA* e *ARF* indutíveis por auxina de *Arabidopsis* resultam em fenótipos que relembram o fenótipo *rum1* de milho com relação à ausência de raízes laterais sobre a raiz primária. Diversos mutantes de ganho de função que não possuem raízes laterais ou cuja formação de raízes laterais  
15 é inibida foram descritos em *Arabidopsis* (gene *Solitary-Root/IAA14* (*SLR/IAA14*) descrito por Fukaki et al (2002), *The Plant Journal* 29 (2): 153-168; gene *Massugu2/IAA19* (*MSG2/IAA19*) descrito por Tatematsu et al (2004), *Plant Cell* 16: 379-393, Okushima et al (2005), *Plant Cell* 17: 444-463 descreveram um mutante duplo *arf7arf19*, que exibe um fenótipo similar aos  
20 mutantes *slr/iaa14* e *msg/iaa19*.

Experimentos *in vitro* indicam que IAA14 interage com ARF7 e ARF19 e que IAA19 interage com ARF7. *Aux/IAA* e ARFs são considerados, portanto, componentes importantes do processo de sinalização de auxina que controla as reações do crescimento vegetal ao hormônio auxina.

25 Apesar da extensa caracterização genética e morfológica do mutante *rum1*, não houve análise molecular do ácido nucleico que codifica a proteína associada ao fenótipo *rum1*. Na verdade, não foi relatada a identidade da proteína codificada por *rum1*.

### DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A presente invenção inclui:

Em uma realização, uma planta que compreende no seu genoma uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos um elemento regulador, em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 85%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 73 e em que a mencionada planta exhibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

Em uma realização, uma planta que compreende no seu genoma uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos um elemento regulador, em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que contém uma sequência de aminoácidos com pelo menos 50% de identidade de sequências, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73, em que a mencionada planta exhibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

Em uma outra realização, uma planta que compreende no seu genoma uma construção de DNA recombinante e compreende:

- a. um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos um elemento regulador, em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou
- b. uma construção de DNA de supressão que compreende

pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a: (i) no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (b) (i) (A); ou (ii) uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região e em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1, em que a mencionada planta exibe uma alteração de pelo menos uma característica agrônômica em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

Em uma outra realização, método de alteração da arquitetura de raiz em plantas, que compreende (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; e (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e exibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante; e, opcionalmente, (c)

obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a mencionada planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e exibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

5           Em uma outra realização, método de avaliação da arquitetura de raiz em plantas, que compreende (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma  
10           sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; e (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante;  
15           (c) avaliação da arquitetura de raiz da planta transgênica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante; e, opcionalmente, (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e, opcionalmente, (e) avaliação da  
20           arquitetura de raiz da planta de prole em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

          Em uma outra realização, método de avaliação da arquitetura de raiz em plantas, que compreende (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um  
25           polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID

Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e (e) avaliação da arquitetura de raiz da planta de prole em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Em uma outra realização, método de determinação de alterações de uma característica agronômica em plantas, que compreende (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; (c) determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante; e, opcionalmente, (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e, opcionalmente, (e) determinação se a planta de prole exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Em uma outra realização, método de determinação de alterações

de uma característica agronômica em plantas, que compreende (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e (d) determinação se a planta de prole exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Em uma outra realização, método de determinação de alterações de uma característica agronômica em uma planta que compreende:

- a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:
  - i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (b) (i) (A); ou
  - ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a

mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;

b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

10 c. determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agrônômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão;

e, opcionalmente, (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e, opcionalmente, (e) determinação se a planta de prole exibe alterações de pelo menos uma característica agrônômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

20 Em uma outra realização, método de determinação de alterações de uma característica agrônômica em plantas que compreende:

a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

25 i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (b)

(i) (A); ou

ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;

b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão e exibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão;

c. obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

d. determinação se a planta de prole exibe uma alteração de pelo menos uma característica agrônômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Em uma outra realização, método de alteração da arquitetura de raiz em uma planta que compreende:

a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de

alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (a) (i) (A); ou

ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1; e

b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão e a planta transgênica exibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão; e, opcionalmente, (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a mencionada planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e a planta de prole exibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Em uma outra realização, método de avaliação da arquitetura de raiz em uma planta que compreende:

a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com

identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (a) (i) (A); ou

5                   ii.       uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no  
10 todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;

                  b.       regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende  
15 no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

                  c.       avaliação da arquitetura de raiz da planta transgênica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão;

                  e, opcionalmente, (d) obtenção de uma planta de prole derivada  
20 da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e, opcionalmente, (e) avaliação da arquitetura de raiz da planta de prole em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

                  Em uma outra realização, método de avaliação da arquitetura de  
25 raiz em uma planta que compreende:

                  a.       introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

- i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (a) (i) (A); ou
- ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;
- b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão;
- c. obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e
- d. avaliação da arquitetura de raiz da planta de prole em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Também são incluídas na presente invenção qualquer prole das plantas acima, quaisquer sementes das plantas acima e células de quaisquer das plantas e prole acima. Método de produção de sementes que pode ser vendido como oferta de produto com arquitetura de raiz alterada que compreende qualquer dos métodos preferidos acima e compreende

adicionalmente a obtenção de sementes da mencionada planta de prole, em que as mencionadas sementes compreendem no seu genoma a mencionada construção de DNA recombinante.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E LISTAGENS DE SEQUÊNCIAS**

5 A presente invenção pode ser compreendida mais completamente a partir da descrição detalhada a seguir e das figuras e Listagem de Sequências anexas que fazem parte do presente pedido.

A Fig. 1 exibe um mapa da sequência genômica de *RUM1*.

A Fig. 2 exibe o mapa físico de *RUM1* e sua sintenia com arroz.

10 A Fig. 3 ilustra o vetor pDONOR®/Zeo.

A Fig. 4 ilustra o vetor pDONOR® 221.

A Fig. 5 ilustra o vetor PHP27840.

A Fig. 6 ilustra o vetor PHP23236.

A Fig. 7 ilustra o vetor PHP10523.

15 A Fig. 8 ilustra o vetor PHP28408.

A Fig. 9 ilustra o vetor PHP20234.

A Fig. 10 ilustra o vetor PHP28529.

A Fig. 11 ilustra o vetor PHP22020.

A Fig. 12 ilustra o vetor PHP23112.

20 A Fig. 13 ilustra o vetor PHP23235.

A Fig. 14 ilustra o vetor PHP29635.

A Fig. 15 ilustra o vetor pIIOIXS2a-FRT87(ni)m.

A Fig. 16 é o meio de crescimento utilizado para o crescimento de milho semi-hidropônico no Exemplo 19.

25 A Fig. 17 é um gráfico que exibe dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de nitrato sobre o crescimento e desenvolvimento de linhagens de milho derivadas de milho duro Gaspe Bay no Exemplo 19.

A Fig. 18 exibe o alinhamento múltiplo das sequências de

aminoácidos de comprimento total de B73-Mu-wt RUM1 (SEQ ID N° 24), B73 RUM1 (SEQ ID N° 29), B73 RUL (SEQ ID N° 39), o mutante rum1 (SEQ ID N° 25) e a proteína de arroz identificada como pertencente à família AUX-IAA (Identificador Geral NCBI n° 34911088, SEQ ID N° 65). Os aminoácidos conservados ao longo de todas as sequências são indicados com um asterisco (\*) na fileira superior; os traços são utilizados pelo programa para maximizar o alinhamento das sequências. O motivo LxLxL descrito no Exemplo 24 é exibido em negrito. Os parâmetros do método utilizados para produzir o alinhamento múltiplo das sequências abaixo foram realizados utilizando o método de alinhamento Clustal (Higgins e Sharp (1989), *CABIOS*. 5: 151-153) com os parâmetros padrão (PENALIDADE DO INTERVALO = 10, PENALIDADE DO COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10).

A Fig. 19 exibe um gráfico do percentual de identidade de sequências para cada par de sequências de aminoácidos exibida na Fig. 18.

As descrições de sequências e a Listagem de Sequências anexas ao presente atendem às regras que regem descrições de sequências de nucleotídeos e/ou aminoácidos em pedidos de patente conforme descrito em 37 C. F. R. § 1.821 – 1.825.

A Listagem de Sequências contém o código de uma letra para caracteres de sequência de nucleotídeos e os códigos de três letras para aminoácidos conforme definido em conformidade com os padrões IUPAC-IUBMB descritos em *Nucleic Acids Res.* 13: 3021-3030 (1985) e em *Biochemical J.* 219 (n° 2): 345-373 (1984), que são incorporados ao presente como referência. Os símbolos e formato utilizados para dados de sequências de aminoácidos e nucleotídeos atendem às regras estabelecidas em 37 C. F. R. § 1.822.

SEQ ID N° 1 é o primer frontal para o marcador de SSR UMC1690 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 2 é o primer reverso para o marcador de SSR UMC1690 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 3 é o primer frontal para o marcador de SSR BNLG 1108 utilizado no Exemplo 1.

5 SEQ ID Nº 4 é o primer reverso para o marcador de SSR BNLG 1108 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 5 é o primer frontal para o marcador UMC1844 utilizado no Exemplo 1.

10 SEQ ID Nº 6 é o primer reverso para o marcador UMC1844 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 7 é o primer frontal para o marcador UMC1915 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 8 é o primer reverso para o marcador UMC1915 utilizado no Exemplo 1.

15 SEQ ID Nº 9 é o primer frontal para o marcador PHP9257A utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 10 é o primer reverso para o marcador PHP9257A utilizado no Exemplo 1.

20 SEQ ID Nº 11 é o primer frontal para o marcador UMC2274 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 12 é o primer reverso para o marcador UMC2274 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 13 é o primer frontal para o marcador de CAP MZA8411 utilizado no Exemplo 1.

25 SEQ ID Nº 14 é o primer reverso para o marcador de CAP MZA8411 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 15 é o primer frontal para o marcador de CAP b0568n15 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 16 é o primer reverso para o marcador de CAP b0568n15 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 17 é o primer frontal para o marcador de CAP MZA8828 utilizado no Exemplo 1.

5 SEQ ID Nº 18 é o primer reverso para o marcador de CAP MZA8828 utilizado no Exemplo 1.

SEQ ID Nº 19 é o fragmento genômico de 4098 bp de b0568n15 que contém o gene *RUM1*.

10 SEQ ID Nº 20 é a sequência do primer frontal RUM1-70F conforme descrito no Exemplo 3.

SEQ ID Nº 21 é a sequência do primer reverso RUM1+40R conforme descrito no Exemplo 3.

SEQ ID Nº 22 é a sequência de cDNA de *RUM1* do tipo selvagem obtida da linhagem mutante (B73-Mu) descrita no Exemplo 3.

15 SEQ ID Nº 23 é a sequência de cDNA de *RUM1* mutante obtida da linhagem mutante (B73-Mu) descrita no Exemplo 3.

SEQ ID Nº 24 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 22.

20 SEQ ID Nº 25 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 23.

SEQ ID Nº 26 é o EST parcial correspondente ao número de acesso CD439449 descrito no Exemplo 4.

SEQ ID Nº 27 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 26.

25 SEQ ID Nº 28 é o cDNA de *RUM1* de comprimento total de B73 descrito no Exemplo 4.

SEQ ID Nº 29 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 28.

SEQ ID N° 30 é a sequência de aminoácidos da proteína IAA8 de *Arabidopsis* (gi: 15227275).

SEQ ID N° 31 é a sequência de aminoácidos da proteína SLRIAA14 de *Arabidopsis* (gi: 22328628).

5 SEQ ID N° 32 é a sequência de aminoácidos da proteína MSG2/IAA19 de *Arabidopsis* (gi: 1532612 ou 17365900).

SEQ ID N° 33 é o primer frontal RUM1-354F utilizado no Exemplo 6.

10 SEQ ID N° 34 é o exon1-R1 de RUM1 reverso utilizado no Exemplo 6.

SEQ ID N° 35 é o primer frontal -132F utilizado no Exemplo 6.

SEQ ID N° 36 é o primer reverso exon-1R2 de RUM1 utilizado no Exemplo 6.

SEQ ID N° 37 é o primer MuTIR utilizado no Exemplo 6.

15 SEQ ID N° 38 é a sequência do cDNA similar a *RUM1 (RUL)* descrito no Exemplo 7.

SEQ ID N° 39 é a sequência de aminoácidos da proteína RUL codificada por SEQ ID N° 38.

SEQ ID N° 40 é o primer frontal RUL -43F descrito no Exemplo 8.

20 SEQ ID N° 41 é o primer reverso RUL +181R descrito no Exemplo 8.

SEQ ID N° 42 é a sequência attB1 descrita no Exemplo 9.

SEQ ID N° 43 é a sequência attB2 descrita no Exemplo 9.

25 SEQ ID N° 44 é a sequência do primer frontal VC062 descrito no Exemplo 9.

SEQ ID N° 45 é a sequência do primer reverso VC063 descrito no Exemplo 9.

SEQ ID N° 46 é a sequência de vetor pDONOR®/Zeo descrito no

Exemplo 9.

SEQ ID Nº 47 é a sequência de vetor pDONOR®/221 descrito no

Exemplo 9.

SEQ ID Nº 48 é a sequência de PHP27840 descrito no Exemplo

5 9.

SEQ ID Nº 49 é a sequência de PHP23236 descrito no Exemplo

9.

SEQ ID Nº 50 é a sequência de PHP10523.

SEQ ID Nº 51 é a sequência do promotor NAS2.

10

SEQ ID Nº 52 é a sequência do promotor GOS2.

SEQ ID Nº 53 é a sequência do promotor ubiquitina.

SEQ ID Nº 54 é a sequência do terminal PINII.

SEQ ID Nº 55 é a sequência de PHP28408.

SEQ ID Nº 56 é a sequência de PHP20234.

15

SEQ ID Nº 57 é a sequência de PHP28529.

SEQ ID Nº 58 é a sequência de PHP22020.

SEQ ID Nº 59 é a sequência de PHP23112.

SEQ ID Nº 60 é a sequência de PHP23235.

SEQ ID Nº 61 é a sequência de PHP29635.

20

SEQ ID Nº 62 é a sequência de pIIOXs2a-FRT87(ni)m.

SEQ ID Nº 63 é a sequência do promotor S2A.

SEQ ID Nº 64 é a sequência de união de DNA GAL4.

SEQ ID Nº 65 é a sequência correspondente ao Identificador  
Geral NCBI nº 34911088.

25

SEQ ID Nº 66 é o cDNA correspondente aos nucleotídeos 155 a  
865 (Parada) do homólogo de RUM1 ebb1c.pk008.p9:fis.

SEQ ID Nº 67 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ  
ID Nº 66.

SEQ ID Nº 68 é o cDNA correspondente aos nucleotídeos 154 a 1218 (Parada) do homólogo de RUM1 smj1c.pk013.h7.f.fis.

SEQ ID Nº 69 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 68.

5 SEQ ID Nº 70 é o cDNA correspondente aos nucleotídeos 225 a 1304 (Parada) do homólogo de RUM1 smj1c.pk007.k12.f.fis.

SEQ ID Nº 71 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 70.

10 SEQ ID Nº 72 é o cDNA correspondente aos nucleotídeos 155 a 865 (Parada) do homólogo de RUM1 wdk1c.pk023.b8.fis.

SEQ ID Nº 73 é a sequência de aminoácidos codificada por SEQ ID Nº 72.

SEQ ID Nº 74 é a sequência correspondente ao Identificador Geral NCBI nº 15229343.

15 SEQ ID Nº 75 é a sequência correspondente ao Identificador Geral NCBI nº 2388689.

SEQ ID Nº 76 é a sequência correspondente ao Identificador Geral NCBI nº 125553286.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

20 O relatório descritivo de cada referência indicada no presente é integralmente incorporado ao presente como referência.

Da forma utilizada no presente e nas reivindicações anexas, as formas no singular, “um”, “uma”, “o” e “a” incluem referências ao plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Desta forma, referência a  
25 “uma planta”, por exemplo, inclui uma série dessas plantas, referência a “uma célula” inclui uma ou mais células e seus equivalentes conhecidos dos técnicos no assunto e assim por diante.

A expressão “arquitetura de raiz” designa a disposição das

diferentes partes que compreendem a raiz. As expressões “arquitetura de raiz”, “estrutura de raiz”, “sistema de raiz” ou “arquitetura de sistema de raiz” são utilizadas de forma intercambiável no presente.

De forma geral, a primeira raiz de uma planta que se desenvolve a partir do embrião é denominada raiz primária. Na maior parte das dicotiledôneas, a raiz primária é denominada raiz mestre. Essa raiz principal cresce para baixo e gera ramos de raízes (laterais). Em monocotiledôneas, a raiz primária das ramificações de plantas gera um sistema de raízes fibrosas.

A expressão “arquitetura de raiz alterada” designa aspectos de alterações das diferentes partes que compõem o sistema de raízes em diferentes etapas do seu desenvolvimento em comparação com uma planta controle ou de referência. Compreende-se que a arquitetura alterada da raiz engloba alterações em um ou mais parâmetros mensuráveis, que incluem, mas sem limitar-se ao diâmetro, comprimento, número, ângulo ou superfície de uma ou mais das partes de sistema de raízes, que incluem, mas sem limitar-se à raiz primária, raiz lateral ou ramo, raízes de coroa, raiz acidental e raízes peludas, todas as quais enquadram-se dentro do escopo da presente invenção. Estas alterações podem gerar uma alteração geral na área ou volume ocupado pela raiz. A planta controle ou de referência não compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante ou construção heteróloga.

“Características agronômicas” são um parâmetro mensurável que inclui, mas sem limitações, o viço, rendimento, velocidade de crescimento, biomassa, peso fresco no amadurecimento, peso seco no amadurecimento, rendimento de frutos, rendimento de sementes, teor total de nitrogênio da planta, teor de nitrogênio dos frutos, teor de nitrogênio das sementes, teor de nitrogênio em um tecido vegetativo, teor total de aminoácidos livres da planta, teor de aminoácidos livres dos frutos, teor de aminoácidos livres das sementes, teor de aminoácidos livres em um tecido vegetativo, teor total de proteína da

planta, teor de proteína dos frutos, teor de proteína das sementes, teor de proteína em um tecido vegetativo, tolerância à seca, absorção de nitrogênio, fixação das raízes, fixação das hastes, altura da planta, comprimento das espigas e índice de colheita.

5 “Índice de colheita” designa o peso do grão dividido pelo peso total da planta.

“*RUM1*-mu-wt” e “*RUM1*” designam o gene do tipo selvagem *RUM1* de *Zea mays* e inclui, sem limitações, SEQ ID N° 22 e SEQ ID N° 28, respectivamente. “*RUM1*-mu-wt” e “*RUM1*” designam a proteína do tipo  
10 selvagem *RUM1* de *Zea mays* codificada por SEQ ID N° 24 e SEQ ID N° 29, respectivamente.

“Similar a *RUM1*” ou *RUL* são utilizados de forma intercambiável no presente, designam o homólogo de nucleotídeo das sequências *RUM1* e *RUM1*-mu-wt de milho e incluem, sem limitações, a sequência de nucleotídeos  
15 de SEQ ID N° 38.

“Similar a *RUM1*” ou *RUL* são utilizados de forma intercambiável no presente, designam o homólogo de polipeptídeo das proteínas *RUM1* e *RUM1*-mu-wt de milho e incluem, sem limitações, a sequência de aminoácidos de SEQ ID N° 39.

20 “*rum1*” designa a sequência de nucleotídeos do mutante de *Zea mays* “sem raízes com meristemas não detectáveis 1” e inclui, sem limitações, SEQ ID N° 23.

“*rum1*” designa o polipeptídeo do mutante de *Zea mays* “sem raízes com meristemas não detectáveis 1” e inclui, sem limitações, SEQ ID N°  
25 25.

“Condições ambientais” designa condições sob as quais a planta é cultivada, tais como a disponibilidade de água, disponibilidade de nutrientes (tais como nitrogênio ou fósforo) ou a presença de insetos ou doenças.

“Fixação de raízes” designa hastes que se desviam do centro. A fixação de raízes pode ocorrer durante os últimos estágios vegetativos e até o amadurecimento da colheita. A fixação de raízes pode ser afetada pela susceptibilidade de híbridos, tensão ambiental (seca, cheias), danos por insetos e por doenças. A fixação de raízes pode ser atribuída, em alguns casos, a lesões pela lagarta das raízes do milho.

“Transgênico” designa qualquer célula, linhagem celular, calo, tecido, parte da planta ou planta, cujo genoma tenha sido alterado pela presença de um ácido nucleico heterólogo, tal como uma construção de DNA recombinante, incluindo os eventos transgênicos iniciais bem como aqueles criados por cruzamentos sexuais ou propagação assexuada a partir do evento transgênico inicial. O termo “transgênico”, da forma utilizada no presente, não engloba a alteração do genoma (cromossômico ou extracromossômico) por meio de métodos convencionais de cultivo de plantas ou por eventos de ocorrência natural tais como fertilização cruzada aleatória, infecções virais não recombinantes, transformação bacteriana não recombinante, transposição não recombinante ou mutação espontânea.

“Genoma”, com referência a células vegetais, engloba não apenas DNA cromossômico encontrado no interior do núcleo, mas também DNA de organelas encontrado em componentes subcelulares (tais como da mitocôndria, plastídeos) da célula.

“Planta” inclui referência a plantas inteiras, órgãos de plantas, tecidos de plantas, sementes, células vegetais e sua prole. Células vegetais incluem, sem limitações, células de sementes, cultivos em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen e microesporos.

“Prole” compreende qualquer geração subsequente de uma planta.

“Transgênico” designa qualquer célula, linhagem celular, calo, tecido, parte da planta ou planta, cujo genoma tenha sido alterado pela presença de um ácido nucleico heterólogo, tal como uma construção de DNA recombinante, incluindo os eventos transgênicos iniciais bem como aqueles criados por cruzamentos sexuais ou propagação assexuada a partir do evento transgênico inicial. O termo “transgênico”, da forma utilizada no presente não engloba a alteração do genoma (cromossômico ou extracromossômico) por meio de métodos convencionais de cultivo de plantas ou por eventos de ocorrência natural tais como fertilização cruzada aleatória, infecções virais não recombinantes, transformação bacteriana não recombinante, transposição não recombinante ou mutação espontânea.

“Planta transgênica” inclui referência a uma planta que compreende, no interior do seu genoma, um polinucleotídeo heterólogo. Preferencialmente, o polinucleotídeo heterólogo é integrado de forma estável no interior do genoma, de tal forma que o polinucleotídeo seja passado para gerações sucessivas. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado ao genoma isoladamente ou como parte de uma construção de DNA recombinante.

“Heterólogo”, com relação a sequência, indica uma sequência que se origina de uma substância exógena ou, caso seja da mesma espécie, que é modificada substancialmente com relação à sua forma nativa em composição e/ou local genômico por meio de intervenção humana deliberada.

“Polinucleotídeo”, “sequência de ácido nucleico”, “sequência de nucleotídeos” ou “fragmento de ácido nucleico” são utilizados de forma intercambiável e referem-se a um polímero de RNA ou DNA que possui fita simples ou dupla e contém opcionalmente bases de nucleotídeos sintéticas, não naturais ou alteradas. Os nucleotídeos (normalmente encontrados na sua forma de 5'-monofosfato) são denominados pela sua designação de letra única

conforme segue: "A" para adenilato ou desoxiadenilato (para RNA ou DNA, respectivamente), "C" para citidilato ou desoxicitidilato, "G" para guanilato ou desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A ou G), "Y" para pirimidinas (C ou T), "K" para G ou T, "H" para A, C ou T, "I" para inosina e "N" para qualquer nucleotídeo.

"Polipeptídeo", "peptídeo", "sequência de aminoácidos" e "proteína" são utilizados de forma intercambiável no presente para designar um polímero de resíduos de aminoácidos. As expressões aplicam-se a polímeros de aminoácidos em que um ou mais resíduos de aminoácidos são um análogo químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como polímeros de aminoácidos de ocorrência natural. As expressões "polipeptídeo", "peptídeo", "sequência de aminoácidos" e "proteína" também incluem modificações que incluem, mas sem limitações, glicosilação, fixação de lipídios, sulfatação, gamacarboxilação de resíduos de ácido glutâmico, hidroxilação e ADP-ribosilação.

"RNA mensageiro (mRNA)" designa o RNA que não contém introns e que pode ser traduzido em proteína pela célula.

"cDNA" designa DNA que é complementar a um modelo de mRNA e sintetizado a partir dele utilizando a enzima transcriptase reversa. O cDNA pode ser de fita única ou convertido em forma de fita dupla utilizando o fragmento Klenow de DNA polimerase I.

Proteína "madura" designa um polipeptídeo processado após a tradução; ou seja, aquele do qual quaisquer pré ou pró-peptídeos presentes no produto de tradução primária tenham sido removidos.

Proteína "precursora" indica o produto primário de tradução de mRNA; ou seja, com pré e pró-peptídeos ainda presentes. Pré e pró-peptídeos podem ser e não se limitam a sinais de localização intracelular.

"Isolado" indica materiais, tais como moléculas de ácido nucleico

e/ou proteínas, que são substancialmente livres ou removidas de outra forma de componentes que normalmente acompanham ou interagem com os materiais em um ambiente de ocorrência natural. Os polinucleotídeos isolados podem ser purificados a partir de uma célula hospedeira na qual ocorrem naturalmente. Os métodos de purificação de ácido nucleico convencionais conhecidos dos técnicos no assunto podem ser utilizados para obter polinucleotídeos isolados. O termo também engloba polinucleotídeos recombinantes e polinucleotídeos sintetizados quimicamente.

“Recombinante” indica uma combinação artificial de dois segmentos de sequências separados de outra forma, tal como por meio de síntese química ou de manipulação de segmentos isolados de ácidos nucleicos por meio de métodos de engenharia genética. “Recombinante” também inclui referência a uma célula ou vetor que tenha sido modificada por meio da introdução de um ácido nucleico heterólogo ou uma célula derivada de uma célula modificada desta forma, mas não engloba a alteração da célula ou vetor por eventos de ocorrência natural (tais como mutação espontânea, transformação, transdução ou transposição natural), tais como os que ocorrem sem intervenção humana deliberada.

“Construção de DNA recombinante” designa uma combinação de fragmentos de ácido nucleico que normalmente não são encontrados juntos na natureza. Conseqüentemente, uma construção de DNA recombinante pode compreender sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de diferentes fontes ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma forma diferente da normalmente encontrada na natureza.

“Sequências reguladoras” designam sequências de nucleotídeos localizadas acima no fluxo (sequências não codificadoras 5'), no fluxo ou abaixo no fluxo (sequências não codificadoras 3') de uma sequência de

codificação e que influenciam a transcrição, processamento ou estabilidade de RNA ou tradução da sequência de codificação associada. As sequências reguladoras podem incluir, mas sem limitações, promotores, sequências líderes de tradução, introns e sequências de reconhecimento de poliadenilação.

5                   “Promotor” designa um fragmento de ácido nucleico capaz de controlar a transcrição de um outro fragmento de ácido nucleico.

                  “Promotor funcional em uma planta” é um promotor capaz de controlar a transcrição em células vegetais, seja ou não a sua origem de uma célula vegetal.

10                   “Promotor específico de tecido” e “promotor preferido por tecido” são utilizados de forma intercambiável e designam um promotor que é expresso predominantemente, mas não necessariamente de forma exclusiva, em um tecido ou órgão, mas que pode também ser expresso em uma célula específica.

15                   “Promotor com desenvolvimento regulado” designa um promotor cuja atividade é determinada por eventos de desenvolvimento.

                  “Ligado de forma operativa” designa a associação de fragmentos de ácidos nucleicos em um único fragmento, de forma que a função de um seja regulada pelo outro. Um promotor é ligado operativamente com um fragmento  
20 de ácido nucleico, por exemplo, quando for capaz de regular a transcrição daquele fragmento de ácido nucleico.

                  “Expressão” designa a elaboração de um produto funcional. A expressão de um fragmento de ácido nucleico pode designar, por exemplo, a transcrição do fragmento de ácido nucleico (tal como transcrição que resulta  
25 em mRNA ou RNA funcional) e/ou tradução de mRNA em uma proteína precursora ou madura.

                  “Fenótipo” indica as características detectáveis de uma célula ou organismo.

“Introduzido”, no contexto de inserção de um fragmento de ácido nucleico (tal como uma construção de DNA recombinante) em uma célula, indica “transfecção”, “transformação” ou “transdução” e inclui referência à incorporação de um fragmento de ácido nucleico em uma célula eucariótica ou 5 procariótica em que o fragmento de ácido nucleico pode ser incorporado ao genoma da célula (tal como cromossomo, plasmídeo, plastídeo ou DNA de mitocôndria), convertido em uma réplica autônoma ou expresso de forma transitória (tal como mRNA transfetado).

“Célula transformada” é qualquer célula na qual tenha sido 10 introduzido um fragmento de ácido nucleico (tal como uma construção de DNA recombinante).

“Transformação”, da forma utilizada no presente, indica transformação estável e transformação transitória.

“Transformação estável” indica a introdução de um fragmento de 15 ácido nucleico em um genoma de um organismo hospedeiro, resultando em herança geneticamente estável. Uma vez transformado de forma estável, o fragmento de ácido nucleico é integrado de forma estável ao genoma do organismo hospedeiro e qualquer geração subsequente.

“Transformação transitória” designa a introdução de um fragmento 20 de ácido nucleico no núcleo ou organela que contém DNA de um organismo hospedeiro, resultando em expressão genética sem herança geneticamente estável.

“Alelo” é uma das várias formas alternativas de um gene que ocupa um dado local sobre um cromossomo. Quando os alelos presentes em 25 um dado local em um par de cromossomos homólogos em uma planta diploide forem idênticos, aquela planta é homozigótica naquele local. Caso os alelos presentes em um dado local sobre um par de cromossomos homólogos em uma planta diploide sejam diferentes, aquela planta é heterozigótica naquele

local. Caso um transgene esteja presente sobre um par de cromossomos homólogos em uma planta diploide, aquela planta é hemizigótica naquele local.

Alinhamentos de sequências e cálculos de identidade percentual podem ser determinados utilizando uma série de métodos de comparação projetados para detectar sequências homólogas que incluem, mas sem limitações, o programa Megalign® da suíte de computação bioinformática LASARGENE (DNASTAR Inc., Madison WI). A menos que indicado em contrário, múltiplo alinhamento das sequências fornecidas no presente foi realizado utilizando o método de alinhamento Clustal V (Higgins e Sharp (1989), *CABIOS*. 5: 151-153) com os parâmetros padrão (PENALIDADE DO INTERVALO = 10 e PENALIDADE DO COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10). Os parâmetros padrão para alinhamentos em pares e cálculo do percentual de identidade de sequências de proteínas utilizando o método Clustal são COMPRIMENTO DE PALAVRA = 1, PENALIDADE DO INTERVALO = 3, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 5 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 5. Para ácidos nucleicos, esses parâmetros são COMPRIMENTO DE PALAVRA = 1, PENALIDADE DO INTERVALO = 5, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 4 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 4. Após o alinhamento das sequências utilizando o programa Clustal V, é possível obter valores de “percentual de identidade” e “divergência” observando-se a tabela “distâncias de sequências” no mesmo programa; a menos que indicado em contrário, os percentuais de identidade e divergências fornecidos e reivindicados no presente foram calculados desta forma.

As técnicas padrão de DNA recombinante e clonagem molecular utilizadas no presente são bem conhecidas na técnica e são descritas de forma mais completa em Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold

Spring Harbor, 1989 ("Sambrook").

Com referência agora às realizações preferidas:

As realizações preferidas incluem polipeptídeos e polinucleotídeos isolados, construções de DNA recombinantes, composições (tais como plantas ou sementes) que compreendem essas construções de DNA recombinantes e métodos que utilizam essas construções de DNA recombinantes.

Polipeptídeos e polinucleotídeos isolados preferidos:

A presente invenção inclui os polipeptídeos e polinucleotídeos isolados preferidos a seguir.

Polinucleotídeo isolado que compreende: (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 e em que a expressão do mencionado polipeptídeo em uma planta resulta em uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante; ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (i), em que o complemento total e a sequência de ácido nucleico de (i) consistem do mesmo número de nucleotídeos e são 100% complementares.

Qualquer dos polinucleotídeos isolados acima pode ser utilizado em qualquer construção de DNA recombinante (incluindo construções de DNA de supressão) de acordo com a presente invenção.

Polipeptídeo isolado que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%,

55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 e em que a expressão do mencionado polipeptídeo em uma planta resulta em uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

Polinucleotídeo isolado que compreende: (i) uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 22, 28, 38, 66, 68, 70 ou 72 e em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo em que a expressão do mencionado polipeptídeo resulta em uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante; ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (i). Qualquer dos polinucleotídeos isolados acima pode ser utilizado em qualquer construção de DNA recombinante (incluindo construções de DNA de supressão) de acordo com a presente invenção. O polinucleotídeo isolado codifica RUM1 ou uma proteína similar a RUM1.

25 Construções de DNA recombinantes e construções de DNA de supressão preferidas:

Em um aspecto, a presente invenção inclui construções de DNA recombinantes (incluindo construções de DNA de supressão).

Em uma realização preferida, uma construção de DNA recombinante compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora (tal como um promotor funcional em uma planta), em que o polinucleotídeo compreende (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos com identidade de 5  
sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 10  
98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (i).

Em uma outra realização preferida, uma construção de DNA recombinante compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora (tal como um promotor funcional em uma 15  
planta), em que o mencionado polinucleotídeo compreende (i) uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%,  
20 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 22, 28, 38, 66, 68, 70 ou 72 ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (i).

25 A Fig. 18 exibe o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de comprimento total de B73-Mu-wt RUM1 (SEQ ID N° 24), B73 RUM1 (SEQ ID N° 29), B73 RUL (SEQ ID N° 39), o mutante rum1 (SEQ ID N° 25) e a proteína de arroz identificada como pertencente à família AUX-IAA

(Identificador Geral NCBI nº 34911088, SEQ ID Nº 65). Os aminoácidos conservados ao longo de todas as sequências são indicados com um asterisco (\*) na fileira superior; o programa utiliza traços para maximizar o alinhamento das sequências. Os parâmetros de método utilizados para produzir o alinhamento múltiplo das sequências abaixo foram realizados utilizando o método de alinhamento Clustal (Higgins e Sharp (1989), *CABIOS* 5: 151-153) com os parâmetros padrão (PENALIDADE DO INTERVALO = 10, PENALIDADE DO COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10) e os parâmetros padrão de alinhamento em pares de COMPRIMENTO DE PALAVRA = 1, PENALIDADE DO INTERVALO = 3, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 5 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 5.

A Fig. 19 exibe um gráfico do percentual de identidade de sequências para cada par de sequências de aminoácidos exibido na Fig. 18.

Em uma outra realização preferida, uma construção de DNA recombinante compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora (tal como um promotor funcional em uma planta), em que o mencionado polinucleotídeo codifica RUM1 ou uma proteína similar a RUM1. Preferencialmente, a RUM1 ou proteína similar a RUM1 é de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Glycine tabacina*, *Glycine soja* e *Glycine tomentella*.

Em um outro aspecto, a presente invenção inclui construções de DNA de supressão.

Uma construção de DNA de supressão compreende preferencialmente pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor funcional em uma planta) ligado operativamente a (a) no todo ou em parte (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%,

62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%,  
75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,  
88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%,  
com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID  
5 N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 ou (ii) um complemento total da sequência de  
ácido nucleico de (a) (i); ou (b) uma região derivada de uma fita com sentido ou  
fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a  
mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de  
sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%,  
10 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%,  
72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,  
85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,  
98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em  
comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo  
15 ou em parte, da qual é derivada a mencionada região e em que o mencionado  
gene alvo de interesse codifica uma proteína RUM1; ou (c) (i) uma sequência  
de ácido nucleico, no todo ou em parte, com identidade de sequências de pelo  
menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%,  
62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%,  
20 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,  
88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%,  
com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID  
N° 22, 28, 38, 66, 68, 70 ou 72 ou (ii) um complemento total da sequência de  
ácido nucleico de (c) (i). A construção de DNA de supressão compreende  
25 preferencialmente uma construção de cossupressão, construção sem sentido,  
construção de supressão viral, construção de supressão de grampos de  
cabelo, construção de supressão de haste e laço, construção de produção de  
RNA de fita dupla, construção de RNAi ou construção de RNA pequena (tal

como uma construção de siRNA ou construção de miRNA).

Compreende-se, como apreciação os técnicos no assunto, que a presente invenção engloba mais que os exemplos de sequências específicos. Alterações em um fragmento de ácido nucleico que resultam na produção de um aminoácido quimicamente equivalente em um dado local, mas não afetam as propriedades funcionais do polipeptídeo codificado, são bem conhecidas na técnica. Um códon para o aminoácido alanina, um aminoácido hidrofóbico, pode ser substituído, por exemplo, por um códon que codifica um outro resíduo menos hidrofóbico, tal como glicina, ou um resíduo mais hidrofóbico, tal como valina, leucina ou isoleucina. De forma similar, pode-se também esperar que alterações que resultam na substituição de um resíduo negativamente carregado por outro, tal como ácido aspártico por ácido glutâmico, ou um resíduo positivamente carregado por outro, tal como lisina por arginina, gerem um produto funcionalmente equivalente. Também se esperaria que as alterações de nucleotídeos que resultam na alteração das partes N-terminal e C-terminal da molécula de polipeptídeo alterassem a atividade do polipeptídeo. Cada uma das modificações propostas encontra-se bem dentro do trabalho rotineiro da técnica, bem como a determinação da retenção da atividade biológica dos produtos codificados.

“Construção de DNA de supressão” é uma construção de DNA recombinante que, quando transformada ou integrada de forma estável ao genoma da planta, resulta no “silenciamento” de um gene alvo na planta. O gene alvo pode ser endógeno ou transgênico para a planta. “Silenciamento”, da forma utilizada no presente com relação ao gene alvo, designa geralmente a supressão de níveis de mRNA ou proteína/enzima expressa pelo gene alvo e/ou o nível da atividade enzimática ou funcionalidade de proteína. Os termos “supressão”, “suprimindo” e “silenciando”, utilizados de forma intercambiável no presente, incluem redução, diminuição, declínio, rebaixamento, inibição,

eliminação ou prevenção. “Silenciamento” ou “silenciamento genético” não especifica mecanismos e é inclusivo, sem limitar-se a sem sentido, cossupressão, supressão viral, supressão de grampo de cabelo, supressão de haste e laço, abordagens com base em RNAi e abordagens com base em RNA

5 pequeno.

Uma construção de DNA de supressão pode compreender uma região derivada de um gene alvo de interesse e pode compreender a sequência de ácido nucleico, no todo ou em parte, da fita com sentido (ou fita sem sentido) do gene alvo de interesse. Dependendo da abordagem a ser

10 utilizada, a região pode ser 100% idêntica ou menos de 100% idêntica (tal como pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

15 idêntica) à fita com sentido (ou fita sem sentido) do gene de interesse, no todo ou em parte.

Construções de DNA de supressão são bem conhecidas na técnica, facilmente construídas após a seleção do gene alvo de interesse e incluem, sem limitações, construções de cossupressão, construções sem

20 sentido, construções de supressão viral, construções de supressão de grampos de cabelo, construções de supressão de haste e laço, construções de produção de RNA de fita dupla e, de forma mais geral, construções de RNAi (interferência de RNA) e pequenas construções de RNA tais como construções de siRNA (RNA com interferência curta) e construções de miRNA (microRNA).

25 “Inibição sem sentido” indica a produção de transcritos de RNA sem sentido capazes de suprimir a expressão da proteína alvo. “RNA sem sentido” indica um transcrito de RNA que é complementar a um transcrito primário alvo ou mRNA, no todo ou em parte, e bloqueia a expressão de um

fragmento de ácido nucleico isolado alvo (Patente Norte-Americana nº 5.107.065). A complementaridade de um RNA sem sentido pode estar com qualquer parte do transcrito genético específico, ou seja, na sequência não codificadora 5', sequência não codificadora 3', introns ou sequência de  
5 codificação.

“Cossupressão” indica a produção de transcritos de RNA com sentido capazes de suprimir a expressão da proteína alvo. RNA “com sentido” indica transcrito de RNA que inclui o mRNA e pode ser traduzido em proteína no interior de uma célula ou *in vitro*. Construções de cossupressão em plantas  
10 foram projetadas anteriormente por meio de concentração na sobre-expressão de uma sequência de ácido nucleico que possui homologia para um mRNA nativo, na orientação com sentido, o que resulta na redução de todo o RNA que possui homologia para a sequência sobre-expressa (vide Vaucheret et al (1998), *Plant J.* 16: 651-659; e Gura (2000), *Nature* 404: 804-808).

15 Uma outra variação descreve o uso de sequências virais de plantas para dirigir a supressão de sequências codificadoras de mRNA próximas (Patente PCT nº WO 98/36083 publicada em vinte de agosto de 1998).

É descrito anteriormente o uso de estruturas de “grampos de  
20 cabelo” que incorporam uma sequência de codificação de mRNA, no todo ou em parte, em uma orientação complementar que resulta em uma estrutura de “haste e laço” potencial para o RNA expresso (Patente PCT nº WO 99/53050, publicada em 21 de outubro de 1999). Neste caso, a haste é formada por polinucleotídeos correspondentes ao gene de interesse inserido em orientação  
25 com ou sem sentido com relação ao promotor e o laço é formado por alguns polinucleotídeos do gene de interesse, que não possuem um complemento na construção. Isso aumenta a frequência de cossupressão ou silenciamento nas plantas transgênicas recuperadas. Para análise da supressão de grampos de

cabelos, vide Wesley, S. V. et al (2003), *Methods in Molecular Biology, Plant Functional Genomics: Methods and Protocols* 236: 273-286.

Foi também efetivamente utilizada uma construção em que a haste é formada por pelo menos trinta nucleotídeos de um gene a ser suprimido e o laço é formado por uma sequência de nucleotídeos aleatória para supressão (Patente PCT nº WO 99/61632, publicada em dois de dezembro de 1999).

O uso de sequências póli-T e póli-A para gerar a haste na estrutura de haste e laço também foi descrito (Patente PCT nº WO 02/00894, publicada em três de janeiro de 2002).

Ainda outra variação inclui o uso de repetições sintéticas para promover a formação de uma haste na estrutura de haste e laço. Demonstrou-se que organismos transgênicos preparados com esses fragmentos de DNA recombinante contêm níveis reduzidos da proteína codificada pelo fragmento de nucleotídeo que forma o laço descrito na Patente PCT nº WO 02/00904, publicada em três de janeiro de 2002.

Interferência de RNA designa o processo de silenciamento genético pós-tradução específico de sequências em animais mediado por RNAs interferentes (siRNAs) curtos (Fire et al, *Nature* 391: 806, 1998). O processo correspondente em plantas é comumente denominado silenciamento genético pós-transcrição (PTGS) ou silenciamento de RNA e também é denominado supressão em fungos. Acredita-se que o processo de silenciamento genético pós-tradução seja um mecanismo de defesa celular conservado de forma evolucionária utilizado para evitar a expressão de genes exógenos e seja compartilhado em comum por diversos filos e flora (Fire et al, *Trends Genet.* 15: 358 1999). Essa proteção da expressão de genes exógenos pode haver evoluído em resposta à produção de RNAs de fita dupla (dsRNAs) derivados de infecção viral ou da integração aleatória de elementos de

transposons em um genoma hospedeiro por meio de uma resposta celular que destrói especificamente RNA de fita simples homólogo de RNA genômico viral. A presença de dsRNA em células aciona a resposta de RNAi por meio de um mecanismo que ainda necessita ser totalmente caracterizado.

5                   A presença de dsRNAs longos em células estimula a atividade de uma enzima ribonuclease III denominada Dicer. O Dicer está envolvido no processamento do dsRNA em pedaços curtos de dsRNA conhecidos como RNAs interferentes curtos (siRNAs) (Berstein et al, *Nature* 409: 363 (2001)). RNAs interferentes curtos derivados da atividade de Dicer possuem

10 tipicamente cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos de comprimento e compreendem cerca de dezenove duplex de pares de base (Elbashir et al, *Genes Dev.* 15: 188 (2001)). O Dicer também foi relacionado na extirpação de RNAs temporais pequenos (stRNAs) com 21 e 22 nucleotídeos de RNA precursor com estrutura conservada que são relacionados ao controle de

15 tradução (Hutvagner et al, 2001, *Science* 293: 834). A respostas de RNAi também apresenta um complexo de endonuclease, comumente denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que media a divisão de RNA de fita única que possui complementaridade de sequências com a fita sem sentido do duplex de siRNA. A divisão do RNA alvo tem lugar no meio da

20 região complementar à fita sem sentido do duplex de siRNA (Elbashir et al, *Genes Dev.* 15: 188 (2001)). Além disso, a interferência de RNA pode também envolver silenciamento genético mediado por RNA pequeno (tal como miRNA), presumivelmente por meio de mecanismos celulares que regulam a estrutura de cromatina e, desta forma, evitam a transcrição de sequências genéticas alvo

25 (vide, por exemplo, Allshire, *Science* 297: 1818-1819 (2002); Volpe et al, *Science* 297: 1833-1837 (2002); Jenuwein, *Science* 297: 2215-2218 (2002); e Hall et al, *Science* 297: 2232-2237 (2002)). Desta forma, as moléculas de miRNA de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas para mediar o

silenciamento genético por meio de interação com transcritos de RNA ou, alternativamente, por meio de interação com sequências genéticas específicas, em que essa interação resulta em silenciamento genético no nível de transcrição ou pós-transcrição.

5 RNAi vem sendo estudado em uma série de sistemas. Fire et al (*Nature* 391: 806, 1998) foram os primeiros a observar RNAi em *C. elegans*. Wianny e Goetz (*Nature Cell Biol.* 2: 70 1999) descrevem RNAi mediado por dsRNA em embriões de camundongo. Hammond et al (*Nature* 404: 293 (2000)) descrevem RNAi em células de *Drosophila* transfectadas com dsRNA. Elbashir  
10 et al (*Nature* 411: 494 (2001)) descrevem RNAi induzido por meio da introdução de duplex de RNAs com 21 nucleotídeos sintéticos em células de mamíferos cultivadas que incluem células de HeLa e rim embrionário humano.

RNAs pequenos desempenham um papel importante no controle da expressão genética. A regulação de muitos processos de desenvolvimento,  
15 que incluem a florescência, é controlada por RNAs pequenos. É agora possível elaborar alterações na expressão genética de genes vegetais utilizando construções transgênicas que produzem RNAs pequenos na planta.

RNAs pequenos aparentemente funcionam por meio de emparelhamento de bases para sequências alvo de DNA ou RNA  
20 complementares. Quando unidos a RNA, RNAs pequenos acionam a divisão de RNA ou inibição de tradução da sequência alvo. Quando unidos a sequências alvo de DNA, acredita-se que RNAs pequenos possam mediar a metilação de DNA da sequência alvo. A consequência destes eventos, independentemente do mecanismo específico, é a inibição da expressão  
25 genética.

Acredita-se que a complementaridade de sequências entre RNAs pequenos e seus RNA alvos ajude a determinar qual mecanismo, divisão de RNA ou inibição de tradução, é empregado. Acredita-se que siRNAs, que são

perfeitamente complementares com os seus alvos, trabalham por meio de  
divisão de RNA. Alguns miRNAs possuem complementaridade perfeita ou  
quase perfeita com os seus alvos e a divisão de RNA foi demonstrada para  
pelo menos alguns desses miRNAs. Outros miRNAs possuem diversas  
5 discordâncias com os seus alvos e, aparentemente, inibem os seus alvos em  
nível de tradução. Novamente, sem restrições a nenhuma teoria específica  
sobre o mecanismo de ação, surge uma regra geral de que complementaridade  
perfeita ou quase perfeita causa divisão de RNA, enquanto a inibição da  
tradução é favorecida quando o duplex de miRNA e alvo contiver muitas  
10 discrepâncias. A exceção evidente é microRNA 172 (miR172) em plantas. Um  
dos alvos de miR172 é APETALA2 (AP2) e, embora miR172 compartilhe  
complementaridade quase perfeita com AP2, ele aparentemente causa inibição  
de tradução de AP2 e não divisão de RNA.

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não codificadores com cerca de  
15 dezenove a cerca de 24 nucleotídeos (nt) de comprimento que foram  
identificados em animais e plantas (Lagos-Quintana et al, *Science* 294: 853-  
858 (2001), Lagos-Quintana et al, *Curr. Biol.* 12: 735-739 (2002); Lau et al,  
*Science* 294: 858-862 (2001); Lee e Ambros, *Science* 294: 862-864 (2001);  
Llave et al, *Plant Cell* 14: 1605-1619 (2002); Mourelatos et al, *Genes Dev.* 16:  
20 720-728 (2002); Park et al, *Curr. Biol.* 12: 1484-1495 (2002); Reinhart et al,  
*Genes Dev.* 16: 1616-1626 (2002)). Estes são processados a partir de  
transcritos precursores mais longos que variam de tamanho de cerca de 70 a  
200 nt e esses transcritos precursores possuem a capacidade de formar  
estruturas de grampos de cabelo estáveis. Em animais, a enzima envolvida no  
25 processamento de precursores de miRNA é denominada Dicer, uma proteína  
similar a RNase III (Grishok et al, *Cell* 106: 23-34 (2001); Hutvagner et al,  
*Science* 293: 834-838 (2001); Ketting et al, *Genes Dev.* 15: 2654-2659 (2001)).  
As plantas também possuem uma enzima similar a Dicer, DCL1 (denominada

anteriormente FÁBRICA DE CARPELO/INTEGUMENTOS CURTOS 1/SUSPENSOR 1) e evidências recentes indicam que ela, como Dicer, está envolvida no processamento dos precursores de grampos de cabelo para gerar miRNAs maduros (Park et al, *Curr. Biol.* 12: 1484-1495 (2002); Reinhart et al, *Genes Dev.* 16: 1616-1626 (2002)). Além disso, está se tornando claro a partir de trabalhos recentes que pelo menos alguns precursores de grampos de cabelo de miRNA originam-se como transcritos poliadenilados mais longos e diversos miRNAs diferentes e grampos de cabelo associados podem estar presentes em um único transcrito (Lagos-Quintana et al, *Science* 294: 853-858 (2001); Lee et al, *EMBO J.* 21: 4663-4670 (2002)). Trabalhos recentes também examinaram a seleção da fita de miRNA a partir do produto de dsRNA decorrente do processamento do grampo de cabelo por meio de DICER (Schwartz et al, 2003, *Cell* 115: 199-208). Aparentemente, a estabilidade (ou seja G:C x teor de A:U e/ou discrepâncias) das duas extremidades do dsRNA processado afeta a seleção de fitas, em que a extremidade com baixa estabilidade é mais fácil de desenrolar por uma atividade de helicase. A fita com extremidade 5' na extremidade com baixa estabilidade é incorporada ao complexo de RISC, enquanto a outra fita é degradada.

MicroRNAs aparentemente regulam genes alvo por meio de união a sequências complementares localizadas nos transcritos produzidos por esses genes. No caso de lin-4 e let-7, os locais alvo estão localizados nas UTRs 3' dos mRNAs alvo (Lee et al, *Cell* 75: 843-854 (1993); Wightman et al, *Cell* 75: 855-862 (1993); Reinhart et al, *Nature* 403: 901-906 (2000); Slack et al, *Mol. Cell* 5: 659-669 (2000)) e existem diversas discrepâncias entre os miRNAs lin-4 e let-7 e os seus locais alvo. A união de miRNA lin-4 ou let-7 aparentemente causa a regulação para baixo de níveis em estado estável da proteína codificada pelo mRNA alvo sem afetar o próprio transcrito (Olsen e Ambros, *Dev. Biol.* 216: 671-680, 1999). Por outro lado, evidências recentes sugerem

que miRNAs podem, em alguns casos, causar divisão de RNA específica do transcrito alvo no interior do local alvo e esta etapa de divisão aparentemente requer 100% de complementaridade entre o miRNA e o transcrito alvo (Hutvagner e Zamore, *Science* 297: 2056-2060, 2002; Llave et al, *Plant Cell* 14: 1605-1619, 2002). Parece provável que miRNAs podem iniciar pelo menos dois processos de regulação de genes alvo: regulação para baixo de proteína quando a complementaridade do alvo for < 100% e divisão de RNA quando a complementaridade do alvo for de 100%. MicroRNAs que iniciam o processo de divisão de RNA são análogos aos RNAs interferentes curtos (siRNAs) com 21 a 25 nt gerados durante interferência de RNA (RNAi) em animais e silenciamento genético pós-transcrição (PTGS) em plantas (Hamilton e Baulcombe, 1999; Hammond et al, 2000; Zamore et al, 2000; Elbashir et al, 2001) e similares são incorporados a um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que é similar ou idêntico ao observado para RNAi.

A identificação dos alvos de miRNAs com bioinformática não foi bem sucedida em animais e isso provavelmente se deve ao fato de que miRNAs de animais possuem um baixo grau de complementaridade com os seus alvos. Por outro lado, abordagens de bioinformática vêm sendo utilizadas com sucesso para prever alvos para miRNAs de vegetais (Llave et al, *Plant Cell* 14: 1605-1619, 2002; Park et al, *Curr. Biol.* 12: 1484-1495, 2002; Rhoades et al, *Cell* 110: 513-520, 2002) e, portanto, aparentemente miRNAs de vegetais possuem complementaridade geral mais alta com seus supostos alvos que miRNAs de animais. A maior parte desses transcritos alvo previstos de miRNAs de plantas codifica membros de famílias de fator de transcrição implicados em formação de padrões de desenvolvimento de plantas ou diferenciação celular.

Uma construção de DNA recombinante (que inclui uma construção de DNA de supressão) de acordo com a presente invenção compreende preferencialmente pelo menos uma sequência reguladora.

Uma sequência reguladora preferida é um promotor.

Pode-se utilizar uma série de promotores em construções de DNA recombinantes (e construções de DNA de supressão) de acordo com a presente invenção. Os promotores podem ser selecionados com base no  
5 resultado desejado e podem incluir promotores constitutivos, específicos de tecidos, indutíveis ou outros para expressão no organismo hospedeiro.

Expressão constitutiva de alto nível do possível gene sob controle do promotor 35S pode possuir efeitos pleiotrópicos. Pode-se testar a eficácia de possíveis genes quando dirigidos por diferentes promotores.

10 Promotores constitutivos apropriados para uso em uma célula hospedeira vegetal incluem, por exemplo, o promotor central do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos descritos em WO 99/43838 e na Patente Norte-Americana nº 6.072.050; o promotor CamV 35S central (Odell et al, *Nature* 313: 810-812 (1985)); actina de arroz (McElroy et al, *Plant Cell* 2: 163-171 (1990)); ubiquitina (Christensen et al, *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 (1989) e Christensen et al, *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689 (1992)); pEMU (Last et al, *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588 (1991)); MAS (Velten et al, *EMBO J.* 3: 2723-2730 (1984)); promotor de ALS (Patente Norte-Americana nº 5.659.026) e similares. Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, os discutidos  
15 nas Patentes Norte-Americanas nº 5.608.149, 5.608.144, 5.604.121, 5.569.597, 5.466.785, 5.399.680, 5.268.463, 5.608.142 e 6.177.611 e GOS2 de milho (WO 00/20571 A2).

Ao selecionar um promotor para uso nos métodos de acordo com a presente invenção, pode ser desejável utilizar um promotor regulado por  
25 desenvolvimento ou específico de tecido.

Um promotor regulado por desenvolvimento ou específico de tecido preferido é uma sequência de DNA que regula a expressão de uma sequência de DNA seletivamente nas células/tecidos de uma planta crítica para

o desenvolvimento de borla, ajuste de semente ou ambos e limita a expressão dessa sequência de DNA ao período de desenvolvimento de borla ou maturação de semente na planta. Qualquer promotor identificável pode ser utilizado nos métodos de acordo com a presente invenção, o que causa a  
5 expressão espacial e temporal desejada.

Os promotores que são específicos de sementes ou embriões e podem ser úteis na presente invenção incluem inibidor tripsina Kunitz de soja (Kti3, Jofuku e Goldberg, *Plant Cell* 1: 1079-1093 (1989), patatina (tubérculos de batata (Rocha-Sosa, M. et al (1989), *EMBO J.* 8: 23-29), convicilina, vicilina  
10 e legumina (cotilédones de ervilha) (Rerie, W. G. et al (1991), *Mol. Gen. Genet.* 259: 149-157; Newbiggin, E. J. et al (1990), *Planta* 180: 461-470; Higgins, T. J. V. et al (1988), *Plant Mol. Biol.* 11: 683-695), zeina (endosperma de milho) (Schemthaner, J. P. et al (1988), *EMBO J.* 7: 1249-1255), faseolina (cotilédone de feijão) (Segupta-Gopalan, C. et al (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:  
15 3320-3324), fito-hemaglutinina (cotilédone de feijão) (Voelker, T. et al (1987), *EMBO J.* 6: 3571-3577), B-conglicinina e glicinina (cotilédone de soja) (Chen, Z-L et al (1988), *EMBO J.* 7: 297-302), glutelina (endosperma de arroz), hordeína (endosperma de cevada) (Marris, C. et al (1988), *Plant Mol. Biol.* 10: 359-366), glutenina e gliadina (endosperma de trigo) (Colot, V. et al (1987),  
20 *EMBO J.* 6: 3559-3564) e esporamina (raiz tuberosa de batata doce) (Hattori, T. et al (1990), *Plant Mol. Biol.* 14: 595-604). Promotores de genes específicos de sementes ligados operativamente a regiões de codificação heteróloga em construções de genes quiméricos mantêm o seu padrão de expressão temporal e espacial em plantas transgênicas. Esses exemplos incluem promotor de gene  
25 de proteína de armazenagem de semente de *Arabidopsis thaliana* 2S para expressar peptídeos de encefalina em sementes de *Arabidopsis* e *Brassica napus* (Vanderkerckhove et al, *Bio/Technology* 7: L929-932 (1989)), lectina de feijão e promotores de betafaseolina de feijão para expressar luciferase (Riggs

et al, *Plant Sci.* 63: 47-57 (1989)) e promotores de glutenina de trigo para expressar coranfenicol acetil transferase (Colot et al, *EMBO J.* 6: 3559-3564 (1987)).

Promotores indutíveis expressam seletivamente uma sequência de DNA ligada operativamente em resposta à presença de um estímulo endógeno ou exógeno, tal como por compostos químicos (indutores químicos) ou em resposta a sinais ambientais, hormonais, químicos e/ou de desenvolvimento. Promotores indutíveis ou regulados incluem, por exemplo, promotores regulados pela luz, calor, tensão, cheia ou seca, fito-hormônios, feridas ou substâncias tais como etanol, jasmonato, ácido salicílico ou agentes de segurança.

Os promotores preferidos incluem os seguintes: 1) o promotor de RD29A indutível por tensão (Kasuga et al (1999), *Nature Biotechnol.* 17: 287-91); 2) promotor de cevada, B22E; a expressão de B22E é específica do pedicelo em sementes de milho em desenvolvimento (*Primary Structure of a Novel Barley Gene Differentially Expressed in Immature Aleurone Layers*; Klemsdal, S. S. et al, *Mol. Gen. Genet.* 228 (1/2): 9-16 (1991)); e 3) promotor de milho, Zag2 (*Identification and Molecular Characterization of ZAG1, the Maize Homolog of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene AGAMOUS*, Schmidt, R. J. et al, *Plant Cell* 5 (7): 729-737 (1993)). *Structural Characterization, Chromosomal Localization and Phylogenetic Evaluation of Two Pairs of AGAMOUS-Like MADS-Box Genes from Maize*, Theissen et al, *Gene* 156 (2): 155-166 (1995); Acesso GenBank NCBI nº X80206)). Transcritos de Zag2 podem ser detectados cinco dias antes da polinização até sete a oito dias após a polinização (DAP) e dirige a expressão no carpelo de inflorescências fêmeas em desenvolvimento e Cim1 que é específico do núcleo de sementes de milho em desenvolvimento. Transcrito de Cim1 é detectado quatro a cinco dias antes da polinização até 6 a 8 dias após a polinização. Outros promotores úteis

incluem qualquer promotor que possa ser derivado de um gene cuja expressão é associada maternalmente a flósculos fêmeas.

Promotores preferidos adicionais para a regulação da expressão das sequências de nucleotídeos de acordo com a presente invenção em plantas são promotores específicos de hastes. Esses promotores específicos de hastes incluem o promotor S2A de alfafa (Acesso GenBank nº EF030816; Abrahams et al, *Plant Mol. Biol.* 27: 513-528 (1995)), o promotor S2B (Acesso GenBank nº EF030817 e similares, incorporados ao presente como referência.

Os promotores podem ser completamente derivados de um gene nativo ou ser compostos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados na natureza, ou mesmo compreender segmentos de DNA sintéticos. Os técnicos no assunto compreendem que diferentes promotores podem dirigir a expressão de um gene em diferentes tecidos ou tipos de células, em diferentes estágios de desenvolvimento ou em resposta a diferentes condições ambientais. Reconhece-se ainda que, como na maior parte dos casos as fronteiras exatas de sequências reguladoras não foram completamente definidas, fragmentos de DNA com alguma variação podem possuir atividade promotora idêntica. Promotores que causam a expressão de um gene na maior parte dos tipos de células na maior parte das vezes são comumente denominados "promotores constitutivos". Novos promotores de vários tipos úteis em células vegetais estão constantemente sendo descobertos; numerosos exemplos podem ser encontrados na compilação de Okamuro, J. K. e Goldberg, R. B., *Biochemistry of Plants* 15: 1-82 (1989).

Os promotores preferidos podem incluir: RIP2, mLIP15, ZmCOR1, Rab17, CaMV 35S, RD29A, B22E, Zag2, SAM sintetase, ubiquitina, CaMV 19S, nos, Adh, sacarose sintase, R-alelo, promotor de células de raízes, os promotores S2A preferidos do tecido vascular (acesso Genbank nº EF030816; SEQ ID Nº 76) e S2B (acesso Genbank nº EF030817) e o promotor constitutivo

GOS2 de *Zea mays*. Outros promotores preferidos incluem promotores preferidos de raízes, tais como o promotor NAS2 de milho, o promotor Cyclo de milho (US 2006/0156439, publicado em treze de julho de 2006), o promotor ROOTMET2 de milho (WO 05/063998, publicada em quatorze de julho de 2005), o promotor CR1BIO (WO 06/055487, publicada em 26 de maio de 2006), CRWAQ81 (WO 05/035770, publicada em 21 de abril de 2005) e o promotor ZRP2.47 de milho (acesso NCBI nº U38790, gi: 1063664).

Construções de DNA recombinante (e construções de DNA de supressão) de acordo com a presente invenção podem também incluir outras sequências reguladoras, que incluem, mas sem limitações, sequências líderes de tradução, introns e sequências de reconhecimento de poliadenilação. Em uma outra realização preferida da presente invenção, uma construção de DNA recombinante de acordo com a presente invenção compreende adicionalmente um amplificador ou silenciador.

Uma sequência de introns pode ser adicionada à região não traduzida 5' ou à sequência de codificação da sequência de codificação parcial para aumentar a quantidade da mensagem madura que se acumula no citosol. Demonstrou-se que a inclusão de um intron divisível na unidade de transcrição nas construções de expressão vegetal e animal aumenta a expressão genética nos níveis de proteína e mRNA em até mil vezes. Buchman e Berg, *Mol. Cell Biol.* 8: 4395-4405 (1988); Callis et al, *Genes Dev.* 1: 1183-1200 (1987). Esse aprimoramento de introns da expressão genética tipicamente é maior quando colocado perto da extremidade 5' da unidade de transcrição. O uso de introns de milho intron Adh1-S 1, 2 e 6 e do intron Bronze-1 é conhecido na técnica. Vide de forma geral *The Maize Handbook*, Capítulo 116, Freeling e Walbot, Eds., Springer, Nova Iorque (1994).

Caso se deseje expressão de polipeptídeos, geralmente é desejável incluir uma região de poliadenilação na extremidade 3' de uma região

de codificação de polinucleotídeos. A região de poliadenilação pode ser derivada do gene natural, de uma série de outros genes vegetais ou de T-DNA. A sequência terminal 3' a ser adicionada pode ser derivada, por exemplo, dos genes nopalino sintase ou octopino sintase ou, alternativamente, de um outro gene vegetal ou, de menor preferência, de qualquer outro gene eucariótico.

Uma sequência líder de tradução é uma sequência de DNA localizada entre a sequência promotora de um gene e a sequência de codificação. A sequência líder de tradução está presente no mRNA totalmente processado acima no fluxo da sequência de início de tradução. A sequência líder de tradução pode afetar o processamento do transcrito primário em mRNA, estabilidade de mRNA ou eficiência de tradução. Foram descritos exemplos de sequências líderes de tradução (Turner, R. e Foster, G. D., *Molecular Biotechnology* 3: 225 (1995)).

Em uma outra realização preferida da presente invenção, uma construção de DNA recombinante de acordo com a presente invenção compreende adicionalmente um amplificador ou silenciador.

Qualquer planta pode ser selecionada para identificação de sequências reguladoras e genes a serem utilizados na criação de construções de DNA recombinantes e construções de DNA de supressão de acordo com a presente invenção. Exemplos de alvos vegetais apropriados para isolamento de genes e sequências reguladoras incluiriam, mas sem limitações, alfafa, maçã, damasco, *Arabidopsis*, alcachofra, rúcula, aspargo, abacate, banana, cevada, feijão, beterraba, groselha preta, mirtilo, brócoli, couve-de-bruxelas, repolho, canola, cantalupo, cenoura, cassava, mamona, couve-flor, aipo, cereja, chicória, coentro, cítricos, clementina, trevo, coco, café, milho, algodão, oxicoco, pepino, pinheiro Douglas, berinjela, endívia, escarola, eucalipto, funcho, figo, alho, cabaço, uva, toronja, mandioca, kiwi, alface, alho-porró, limão, lima, pinheiro Loblolly, linhaça, manga, melão, cogumelo, nectarina,

nozes, aveia, palma oleaginosa, colza oleaginosa, quiabo, azeitona, cebola, laranja, plantas ornamentais, palma, mamão, salsa, pastinaca, ervilha, pêsego, amendoim, pera, pimenta, pinha, abacaxi, plátano, ameixa, romã, álamo, batata, abóbora, marmelo, pinheiro radiata, chicória vermelha, rabanete, colza, framboesa, arroz, centeio, sorgo, pinheiro do sul, soja, espinafre, moranga, morango, beterraba, cana-de-açúcar, girassol, batata-doce, goma doce, tangerina, chá, fumo, tomate, triticale, grama, nabo, vinha, melancia, trigo, cará e abobrinha. As plantas particularmente preferidas para identificação de sequências reguladoras são *Arabidopsis*, milho, trigo, soja e algodão.

#### COMPOSIÇÕES PREFERIDAS:

Uma composição preferida de acordo com a presente invenção é uma planta que compreende no seu genoma qualquer das construções de DNA recombinantes (incluindo qualquer das construções de DNA de supressão) de acordo com a presente invenção (tais como as construções preferidas discutidas acima). A composição preferida também inclui qualquer prole da planta e qualquer semente obtida da planta ou sua prole. Prole inclui gerações subsequentes obtidas por meio de autopolinização ou cruzamento de uma planta. A prole também inclui híbridos e congênitos.

Preferencialmente, em safras propagadas por sementes híbridas, plantas transgênicas maduras podem ser autopolinizadas para produzir uma planta congênita homozigótica. A planta congênita produz sementes que contêm a construção de DNA recombinante recém introduzida (ou construção de DNA de supressão). Estas sementes podem ser cultivadas para produzir plantas que exibiriam uma característica agrônômica alterada (tal como uma característica agrônômica aprimorada sob condições de limitação de fosfato ou nitrogênio) ou utilizadas em um programa de cultivo para produzir sementes híbridas, que podem ser cultivadas para produzir plantas que exibiriam arquitetura de raiz alterada. Preferencialmente, as sementes são milho.

Preferencialmente, a planta é uma planta monocotiledônea ou dicotiledônea, de maior preferência uma planta de milho ou soja, de preferência ainda maior uma planta de milho, tal como uma planta híbrida de milho ou uma planta congênita de milho. A planta pode também ser girassol, sorgo, canola, trigo, alfafa, algodão, arroz, cevada ou milho branco.

Preferencialmente, a construção de DNA recombinante é integrada de forma estável ao genoma da planta.

Realizações particularmente preferidas incluem, mas sem limitar-se às realizações preferidas a seguir:

1. Planta (preferencialmente uma planta de milho ou soja) que compreende no seu genoma uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 e em que a mencionada planta exibe uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante. Preferencialmente, a planta exibe ainda uma alteração de pelo menos uma característica agrônômica em comparação com a planta controle.
2. Planta (preferencialmente uma planta de milho ou soja) que compreende no seu genoma uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o mencionado polinucleotídeo codifica RUM1 ou

uma proteína similar a RUM1 e em que a mencionada planta exibe uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante. Preferencialmente, a planta exibe ainda uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação com a planta controle. Preferencialmente, RUM1 ou proteína similar a RUM1 é de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Glycine tabacina*, *Glycine soja* ou *Glycine tomentella*.

3. Planta (preferencialmente uma planta de milho ou soja) que compreende no seu genoma uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou uma proteína similar a RUM1 e em que a mencionada planta exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

4. Planta (preferencialmente uma planta de milho ou soja) que compreende no seu genoma uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a (a)

uma sequência de ácido nucleico, no todo ou em parte, que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (b) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (a), em que a mencionada planta exibe uma alteração de pelo menos uma característica agrônômica em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

5. Qualquer prole das plantas acima nas realizações preferidas 1 a 4, qualquer semente das plantas acima nas realizações preferidas 1 a 4, qualquer semente de prole das plantas acima nas realizações preferidas 1 a 4 e célula de qualquer das plantas acima nas realizações preferidas 1 a 4 e sua prole.

Em qualquer das realizações preferidas 1 a 5 acima ou quaisquer outras realizações da presente invenção, a construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão) compreende preferencialmente pelo menos um promotor que é funcional em uma planta como uma sequência reguladora preferida.

Em qualquer das realizações preferidas 1 a 5 acima ou quaisquer outras realizações da presente invenção, a alteração de pelo menos uma característica agrônômica é um aumento ou redução, preferencialmente um aumento.

Em qualquer das realizações preferidas 1 a 5 acima ou quaisquer outras realizações da presente invenção, pelo menos um dentre viço,

rendimento, velocidade de crescimento, biomassa, peso fresco no amadurecimento, peso seco no amadurecimento, rendimento de frutos, rendimento de sementes, teor total de nitrogênio da planta, teor de nitrogênio dos frutos, teor de nitrogênio das sementes, teor de nitrogênio em um tecido vegetativo, teor total de aminoácidos livres da planta, teor de aminoácidos livres dos frutos, teor de aminoácidos livres das sementes, teor de aminoácidos livres em um tecido vegetativo, teor total de proteína da planta, teor de proteína dos frutos, teor de proteína das sementes, teor de proteína em um tecido vegetativo, tolerância à seca, absorção de nitrogênio, fixação das raízes e índice de colheita.

Dentre estes, frescor, índice de colheita, rendimento, biomassa e resistência à fixação das raízes são características agronômicas particularmente preferidas para alteração (preferencialmente, aumento).

Em qualquer das realizações preferidas 1 a 5 a seguir ou quaisquer outras realizações da presente invenção, a planta exhibe preferencialmente a alteração de pelo menos uma característica agronômica, independentemente, por exemplo, da disponibilidade de água e nutrientes em comparação com uma planta controle.

Os técnicos comuns no assunto são familiares com protocolos de determinação de alterações na arquitetura das raízes das plantas. Alterações da arquitetura das raízes podem ser determinadas, por exemplo, por meio de contagem dos números de raízes nodais dos três ou quatro nós superiores das plantas cultivadas em estufa ou da largura da faixa de raízes. Outras medidas de alteração na arquitetura de raiz incluem, mas sem limitar-se a alterações do vigor, crescimento, tamanho, rendimento, biomassa ou resistência à fixação das raízes em comparação com uma planta controle ou referência.

Os Exemplos abaixo descrevem alguns protocolos representativos e métodos de detecção de alterações na arquitetura das raízes.

Pode-se também avaliar alterações da arquitetura das raízes por meio da capacidade da planta de manter limites de rendimento suficientes em testes de campo sob diversas condições ambientais (tais como excesso ou limitação de nutrientes, excesso ou limitação de água, exposição a insetos ou doenças) por meio da medição de rendimento substancialmente equivalente nessas condições em comparação com condições de nutrientes ou água normais, ou da medição da redução de rendimento sob condições de excesso ou limitação de nutrientes e água em comparação com uma planta controle ou de referência.

Alterações da arquitetura de raiz podem também ser medidas por meio de determinação da resistência à fixação de raízes das plantas transgênicas em comparação com plantas controle ou de referência.

Os técnicos comuns no assunto reconheceriam facilmente uma planta controle ou referência apropriada a ser utilizada ao determinar ou medir uma característica agrônômica ou fenótipo de uma planta transgênica em qualquer realização da presente invenção na qual se utilize uma planta controle ou referência (tais como composições ou métodos conforme descrito no presente). Como forma de ilustrações não limitadoras, por exemplo:

1. Prole de uma planta transformada que é hemizigótica com relação a uma construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão), de tal forma que a prole seja segregada em plantas que compreendem ou não compreendem a construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão); em que a prole que compreende a construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão) seria tipicamente medida com relação à prole que não compreende a construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão) (ou seja, em que a prole que não compreende a construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão) é a planta controle ou de referência).

2. Introgessão de uma construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão) em uma linhagem congênita, tal como em milho, ou em uma variedade, tal como em soja; a linhagem que sofreu introgessão seria tipicamente medida com relação à linhagem de variedade ou congênita parental (ou seja, a linhagem de variedade ou congênita parental é a planta de controle ou de referência).

3. Duas linhagens híbridas, em que a primeira linhagem híbrida é produzida a partir de duas linhagens congênicas parentais e a segunda linhagem híbrida é produzida a partir das mesmas duas linhagens congênicas parentais, exceto pelo fato de que uma das linhagens congênicas parentais contém uma construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão); a segunda linhagem híbrida seria tipicamente medida com relação à primeira linhagem híbrida (ou seja, a linhagem de variedade ou congênita parental é a planta controle ou de referência).

4. Planta que compreende uma construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão): a planta pode ser determinada ou medida com relação a uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão), mas que, de outra forma possui um antecedente genético comparável à planta (que compartilha, por exemplo, identidade de sequências de pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de material genético nuclear em comparação com a planta que compreende a construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão). Existem muitos métodos laboratoriais disponíveis para análise, comparação e caracterização de antecedentes genéticos de plantas; dentre estes, encontram-se eletroforese de isozimas, polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), DNAs polimórficos amplificados aleatoriamente (RAPDs), reação em cadeia de polimerase com primer arbitrário

(AP-PCR), impressão digital por amplificação de DNA (DAF), regiões amplificadas caracterizadas por sequências (SCARs), polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP@s) e repetições de sequências simples (SSRs), que também são denominadas Microsatélites.

5 Além disso, os técnicos comuns no assunto reconheceriam facilmente que uma planta de controle ou de referência apropriada a ser utilizada durante a determinação ou medição de um fenótipo ou característica agronômica de uma planta transgênica não incluiria uma planta que houvesse sido selecionada anteriormente, por meio de mutagênese ou transformação,  
10 pelas características agronômicas ou fenótipo desejado.

#### **MÉTODOS PREFERIDOS:**

Os métodos preferidos incluem, mas sem limitar-se a métodos de alteração da arquitetura de raiz em plantas, métodos de avaliação de alteração de arquitetura de raiz em plantas, métodos de alteração de características agronômicas em plantas, métodos de avaliação de alterações de características agronômicas em plantas e métodos de produção de sementes.  
15 Preferencialmente, a planta é uma planta monocotiledônea ou dicotiledônea, de maior preferência uma planta de milho ou soja, de preferência ainda maior uma planta de milho. A planta pode também ser girassol, sorgo, canola, trigo, alfafa,  
20 algodão, arroz, cevada ou milho branco. A semente é preferencialmente uma semente de milho ou soja, de maior preferência uma semente de milho e, de preferência ainda maior, uma semente híbrida de milho ou semente congênita de milho.

Os métodos particularmente preferidos incluem, mas sem  
25 limitações, os seguintes:

Método de alteração da arquitetura de raiz de plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado

operativamente a pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta), em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; e (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e exibe uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante. O método pode compreender adicionalmente (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica.

Método de alteração da arquitetura de raiz de plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a (i) uma sequência de ácido nucleico, no todo ou em parte, que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (a) (i); e (b)

regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e exibe uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante. O método pode compreender adicionalmente (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica.

Método de alteração da arquitetura de raiz de plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou uma proteína similar a RUM1; e (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e exibe uma arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante. O método pode compreender adicionalmente (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica.

Método de avaliação da arquitetura de raiz alterada de plantas,

que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta), em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e (c) avaliação da planta transgênica para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante. O método pode compreender adicionalmente (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e (e) avaliação da planta de prole para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Método de avaliação da arquitetura de raiz alterada de plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a, no todo ou em parte, (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%,

56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%,  
69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%,  
82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,  
95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento  
5 Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 ou (ii)  
um complemento total da sequência de ácido nucleico de (a) (i); (b)  
regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável  
após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a  
construção de DNA de supressão; e (c) avaliação da planta transgênica para  
10 determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta  
controle que não compreende a construção de DNA de supressão. O método  
pode compreender adicionalmente (d) obtenção de uma planta de prole  
derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu  
genoma a construção de DNA de supressão; e (e) avaliação da planta de prole  
15 para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta  
controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Método de avaliação da arquitetura de raiz alterada de plantas,  
que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma  
construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência  
20 reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta) ligada  
operativamente a uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem  
sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a  
mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de  
sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%,  
25 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%,  
72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,  
85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,  
98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em

comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, do qual a mencionada região é derivada, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou uma proteína similar a RUM1; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (c) avaliação da planta transgênica para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão. O método pode compreender adicionalmente (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (e) avaliação da planta de prole para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Método de avaliação da arquitetura de raiz alterada de plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta), em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; (c) obtenção de uma planta de prole

derivada da mencionada planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e (d) avaliação da planta de prole para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Método de avaliação da arquitetura de raiz alterada de plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a, no todo ou em parte, (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73 ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (a) (i); (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; (c) obtenção de uma planta de prole derivada da mencionada planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (d) avaliação da planta de prole para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Método de avaliação da arquitetura de raiz alterada de plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma

construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de 5  
sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 10  
98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou uma proteína similar a RUM1; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável 15  
após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (d) avaliação da planta de prole para determinar arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta 20  
controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Método de avaliação de alteração de uma característica agronômica em plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma 25  
sequência reguladora (preferencialmente, um promotor funcional em uma planta), em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%,

62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a mencionada construção de DNA recombinante; e (c) determinação se a planta transgênica exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante. O método pode compreender adicionalmente (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e (e) determinação se a planta de prole exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Método de avaliação de uma alteração de uma característica agronômica em plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a, no todo ou em parte, (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29,

39, 67, 69, 71 ou 73, ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (i); (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (c) determinação se a planta transgênica exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão. O método pode compreender ainda (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (e) determinação se a planta de prole exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Método de avaliação de alteração de uma característica agronômica em plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica uma proteína RUM1; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável

após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (c) determinação se a planta transgênica exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão. O método pode compreender adicionalmente (d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (e) determinação se a planta de prole exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Método de avaliação de uma alteração de uma característica agronômica em plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor funcional em uma planta), em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73, (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a mencionada construção de DNA recombinante; (c) obtenção de uma planta de prole derivada da mencionada planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e (d) determinação se a planta de prole

exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Método de avaliação de uma alteração de uma característica agronômica em plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor funcional em uma planta) ligada operativamente a, no todo ou em parte, (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73, ou (ii) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (i); (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; (c) obtenção de uma planta de prole derivada da mencionada planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (d) determinação se a planta de prole exibe uma alteração em pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

Método de avaliação de uma alteração de uma característica agronômica em plantas, que compreende: (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos uma sequência reguladora (preferencialmente um promotor

funcional em uma planta) ligada operativamente a uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica uma proteína RUM1; (b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; (c) obtenção de uma planta de prole derivada da mencionada planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e (d) determinação se a planta de prole exibe uma alteração em pelo menos uma característica agrônômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

Método de produção de sementes (preferencialmente sementes que possam ser vendidas como uma oferta de produto com arquitetura de raiz alterada) que compreende qualquer dos métodos preferidos acima e que compreende adicionalmente a obtenção de sementes da mencionada planta de prole, em que as mencionadas sementes compreendem no seu genoma a mencionada construção de DNA recombinante (ou construção de DNA de supressão).

Em qualquer dos métodos preferidos acima, na mencionada etapa de introdução, a mencionada célula vegetal regenerável compreende

preferencialmente uma célula de calo (preferencialmente embriogênico), uma célula de gameta, uma célula de meristema ou uma célula de embrião imaturo. As células vegetais regeneráveis são preferencialmente de uma linhagem de milho congênita.

5                   Em qualquer dos métodos preferidos acima ou quaisquer outras realizações de métodos de acordo com a presente invenção, a mencionada etapa de regeneração compreende preferencialmente: (i) cultivo das mencionadas células vegetais transformadas em meios que compreendem um hormônio promotor embriogênico até observar-se a organização de calos; (ii)  
10                   transferência das mencionadas células vegetais transformadas da etapa (i) para um primeiro meio que inclui um hormônio promotor da organização de tecidos; e (iii) subcultivo das mencionadas células vegetais transformadas após a etapa (ii) sobre um segundo meio, para permitir alongamento dos brotos, desenvolvimento das raízes ou ambos.

15                   A introdução de construções de DNA recombinantes de acordo com a presente invenção em plantas pode ser conduzida por meio de qualquer método apropriado, incluindo, mas sem limitar-se a absorção direta de DNA, tratamento químico, eletroporação, microinjeção, fusão celular, infecção, transferência de DNA mediada por vetor, bombardeamento ou transformação  
20                   mediada por *Agrobacterium*.

                  Em qualquer dos métodos preferidos acima ou quaisquer outras realizações de métodos de acordo com a presente invenção, a pelo menos uma característica agrônômica é preferencialmente selecionada a partir do grupo que consiste de viço, rendimento, velocidade de crescimento, biomassa,  
25                   peso fresco no amadurecimento, peso seco no amadurecimento, rendimento de frutos, rendimento de sementes, teor total de nitrogênio da planta, teor de nitrogênio dos frutos, teor de nitrogênio das sementes, teor de nitrogênio em um tecido vegetativo, teor total de aminoácidos livres da planta, teor de

aminoácidos livres dos frutos, teor de aminoácidos livres das sementes, teor de aminoácidos livres em um tecido vegetativo, teor total de proteína da planta, teor de proteína dos frutos, teor de proteína das sementes, teor de proteína em um tecido vegetativo, tolerância à seca, absorção de nitrogênio, fixação de raízes, fixação de hastes, altura da planta, comprimento da espiga e índice de colheita; em que viço, rendimento, biomassa ou resistência à fixação de raízes são características agronômicas particularmente preferidas para alteração (preferencialmente aumento).

Em qualquer dos métodos preferidos acima ou quaisquer outras realizações dos métodos de acordo com a presente invenção, a planta exhibe preferencialmente a alteração de pelo menos uma característica agronômica, independentemente das condições ambientais em comparação com uma planta controle (tal como disponibilidade de água e nutrientes, insetos ou doenças).

A introdução de construções de DNA recombinantes de acordo com a presente invenção em plantas pode ser conduzida por meio de qualquer método apropriado, incluindo, mas sem limitações, absorção direta de DNA, tratamento químico, eletroporação, microinjeção, fusão celular, infecção, transferência de DNA mediada por vetor, bombardeamento ou transformação mediada por *Agrobacterium*.

Os métodos preferidos são descritos abaixo nos Exemplos.

Outros métodos preferidos de transformação de dicotiledôneas, principalmente utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, e obtenção de plantas transgênicas incluem os publicados para algodão (Patente Norte-Americana nº 5.004.863, Patente Norte-Americana nº 5.159.135, Patente Norte-Americana nº 5.518.908); soja (Patente Norte-Americana nº 5.569.834, Patente Norte-Americana nº 5.416.011, McCabe et al, *Bio/Technology* 6: 923 (1988), Christou et al, *Plant Physiol.* 87: 671-674 (1988)); Brassica (Patente Norte-Americana nº

5.463.174); amendoim (Cheng et al, *Plant Cell Rep.* 15: 653-657 (1996), McKently et al, *Plant Cell Rep.* 14: 699-703 (1995)); mamão; e ervilha (Grant et al, *Plant Cell Rep.* 15: 254-258 (1995)).

A transformação de monocotiledôneas utilizando eletroporação, bombardeamento de partículas e *Agrobacterium* também foi relatada e é incluída como método preferido, tal como transformação e regeneração de plantas atingida em aspargos (Bytebier et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 5354 (1987)); cevada (Wan e Lemaux, *Plant Physiol.* 104: 37 (1994)); *Zea mays* (Rhodes et al, *Science* 240: 204 (1988), Gordon-Kamm et al, *Plant Cell* 2: 603-618 (1990), Fromm et al, *Bio/Technology* 8: 833 (1990), Koziel et al, *Bio/Technology* 11: 194 (1993), Armstrong et al, *Crop Science* 35: 550-557 (1995)); aveia (Somers et al, *Bio/Technology* 10: 1589 (1992)); orquídea (Horn et al, *Plant Cell Rep.* 7: 469 (1988)); arroz (Toriyama et al, *Theor. Appl. Genet.* 205: 34 (1986); Part et al, *Plant Mol. Biol.* 32: 1135-1148 (1996); Abedinia et al, *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 133-141 (1997); Zhang e Wu, *Theor. Appl. Genet.* 76: 835 (1988); Zhang et al, *Plant Cell Rep.* 7: 379 (1988); Battraw e Hall, *Plant Sci.* 86: 191-202 (1992); Christou et al, *Bio/Technology* 9: 957 (1991)); centeio (De la Pena et al, *Nature* 325: 274 (1987); cana-de-açúcar (Bower e Birch, *Plant J.* 2: 409 (1992)); festuca alta (Wang et al, *Bio/Technology* 10: 691 (1992)); e trigo (Vasil et al, *Bio/Technology* 10: 667 (1992); Patente Norte-Americana nº 5.631.152).

Existe uma série de métodos de regeneração de plantas a partir de tecido vegetal. O método de regeneração específico dependerá do tecido vegetal inicial e da espécie de planta específica a ser regenerada.

A regeneração, desenvolvimento e cultivo de plantas a partir de transformadores de protoplastas de tecidos isolados ou de diversos explantes transformados é bem conhecida na técnica (Weissbach e Weissbach, em *Methods for Plant Molecular Biology* (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego

CA (1988)). Este processo de regeneração e crescimento inclui tipicamente as etapas de seleção de células transformadas, cultivo das células individualizadas por meio das etapas habituais de desenvolvimento embriônico ao longo da etapa de plantículas enraizadas. Sementes e embriões transgênicos são regenerados de forma similar. Os brotos enraizados transgênicos resultantes são plantados em seguida em um meio apropriado de crescimento de plantas, tal como solo.

O desenvolvimento ou regeneração de plantas que contêm o fragmento de ácido nucleico isolado exógeno que codifica uma proteína de interesse é bem conhecido na técnica. Preferencialmente, as plantas regeneradas são autopolinizadas para fornecer plantas transgênicas homozigóticas. Caso contrário, o pólen obtido das plantas regeneradas é cruzado com plantas cultivadas com sementes de linhagens agronomicamente importantes. Por outro lado, o pólen das plantas dessas linhagens importantes é utilizado para polinizar plantas regeneradas. Uma planta transgênica de acordo com a presente invenção que contém um polipeptídeo desejado é cultivada utilizando métodos bem conhecidos dos técnicos no assunto.

#### EXEMPLOS

A presente invenção é adicionalmente ilustrada nos Exemplos a seguir, nos quais as partes e percentuais são em peso e os graus são Celsius, a menos que indicado em contrário. Dever-se-á compreender que estes Exemplos, embora indiquem realizações preferidas da presente invenção, são fornecidos apenas como forma de ilustração. A partir da discussão acima e destes Exemplos, os técnicos no assunto podem determinar as características essenciais da presente invenção e, sem abandonar o seu espírito e escopo, podem realizar diversas alterações e modificações da presente invenção para adaptá-la a diversos usos e condições. Desta forma, diversas modificações da presente invenção, além das exibidas e descritas no presente, serão evidentes

para os técnicos no assunto a partir do relatório descritivo acima. Essas modificações também se destinam a enquadrar-se dentro do escopo das reivindicações anexas.

### EXEMPLO 1

5

#### CLONAGEM DE *RUM1* COM BASE EM MAPAS

A mutação *rum1* foi mapeada utilizando uma população de mapeamento e as suas sementes de milho correspondentes, segregando em busca da mutação *rum1*. As populações de mapeamento consistiram de 3886 plantas de milho derivadas de um cruzamento F1 entre a linhagem que conduz a mutação *rum1* e a linhagem congênita F7. A linhagem que conduz a mutação *rum1* foi isolada de famílias F2 que sofreram mutagênese geradas de autocruzamentos F1 entre a linhagem congênita B73 e estoques de *Mutator* ativo. Por conveniência, esta linhagem foi denominada B73-Mu.

Plantas *rum1/rum1* homozigóticas foram avaliadas duas vezes em sete e dez dias após a germinação na forma de plantas sem raízes laterais visíveis sobre as raízes primárias quando cultivadas sobre rolos de papel. Um total de 630 plantas foi recuperado da população em mapeamento. Essas plantas foram selecionadas para determinar mapeamento fino do local *rum1*.

DNA foi extraído dessas plantas utilizando procedimentos de biologia molecular padrão.

Para obter plantas F2 que conduzem recombinação perto do local *rum1*, foram utilizados marcadores de DNA com base em PCR (SSRs) presentes no Banco de Dados Genômicos e Genéticos de Milho (MaizeGDB). Quando estes não eram disponíveis, marcadores de CAP (primers de PCR específicos de alelos) foram desenvolvidos a partir das sequências particulares da DuPont de clones de BAC (Cromossomo Artificial Bacteriano) com posições de mapa conhecidas. Os primers de CAP e de SSR foram utilizados em uma reação de PCR contendo 10 ng de DNA.

Marcador de SSR lateral UMC1690 (primer frontal UMC1690 (SEQ ID N° 1), primer reverso UMC1690 (SEQ ID N° 2)) e BNLG1108 (primer frontal BNLG1108 (SEQ ID N° 3), primer reverso BNLG1108 (SEQ ID N° 4)) foram recuperados do MaizeGDB. Esses marcadores estão localizados a 544,6 cM e 618,6 cM do Cromossomo 3, respectivamente, com base nos vizinhos 3 do mapa público IBM2 2004.

Amplificações de marcadores de SSR foram realizadas em uma reação de PCR de 10 µl utilizando a mistura Qiagen HotStart (Qiagen, Valencia CA) e 10 ng de DNA. As condições do ciclo térmico foram: 95 °C por quinze minutos (um ciclo), 94 °C por trinta segundos, 60 °C por trinta segundos, 72 °C por sessenta segundos (quarenta ciclos) e 72 °C por cinco minutos. Produtos de amplificação foram examinados para determinar polimorfismos sobre agarose em alta resolução a 4% (Sigma-Aldrich, Saint Louis MO).

Ao utilizar estes dois conjuntos de primers em uma população inicial de 213 plantas *rum1*, foi obtido um total de 16 dentre 213 recombinantes, 14 com marcador UMC1690 e dois do marcador BNLG1108, o que indica que *rum1* estava mais próximo de BNLG1108.

A fim de obter marcadores genéticos mais próximos de *rum1*, mais primers foram recuperados do MaizeGDB com base na sua posição ao longo do cromossomo 3 e testados sobre as 213 plantas *rum1* mencionadas acima mais 204 plantas *rum1* adicionais, em um total de 417 plantas *rum1*. Particularmente, os marcadores UMC1844 (primer frontal UMC1844 (SEQ ID N° 5), primer reverso UMC1844 (SEQ ID N° 6)) geraram 15 de 417 recombinantes e o marcador UMC1915 (primer frontal UMC1915 (SEQ ID N° 7), primer reverso UMC1915 (SEQ ID N° 8)) gerou 14 dentre 417 recombinantes, o que indica uma distância de 1,8 cM e 1,7 cM do local de *rum1*, respectivamente. Os marcadores UMC1844 e UMC1915 foram posicionados fisicamente por meio de hibridização sobre um único contíguo de

milho, denominado 320 (banco de dados Genomix da Dupont).

Foram analisados dois outros marcadores de RRS relatados como localizados entre UMC1844 e UMC1915 sobre o mapa de vizinhos 3 público IBM2 2004, mas não fisicamente posicionados sobre o contíguo 320. A  
5 seleção da biblioteca BAC pública utilizando o marcador PHP9257A (primer frontal PHP9257A (SEQ ID Nº 9), primer reverso PHP9257A (SEQ ID Nº 10)) ou marcador UMC2274 (primer frontal UMC2274 (SEQ ID Nº 11), primer reverso UMC2274 (SEQ ID Nº 12)) como sondas revelou que PHP9257A localiza-se imediatamente abaixo no fluxo de UMC1844 e UMC2274 localiza-se  
10 imediatamente acima no fluxo de UMC1915 sobre o contíguo 320. O marcador PHP9257A gerou onze recombinantes, enquanto o marcador UMC2274 gerou seis recombinantes, o que indica uma distância de 1,3 cM e 0,7 cM a partir do local *rum1*, respectivamente. A distância física que compreende os dois marcadores engloba cerca de 10 BACs.

15 Com base nesta informação, foram projetados novos marcadores de CAP utilizando sequências terminais de BAC disponíveis dos BACs que constituem a região de contíguo 320 rodeada pelos marcadores PHP9257A e UMC2274.

O marcador de tampa MZA8411 (primer frontal MZA8411 (SEQ ID  
20 Nº 13), primer reverso MZA8411 (SEQ ID Nº 14)) foi projetado com base na sequência de MZA8411, que se encontra abaixo no fluxo de PHP9257A. Este conjunto de primers amplifica uma região de 544 bp, que exhibe polimorfismo entre F7 e a linhagem antecedente mutante após a restrição com a enzima 5-cortadora *TspRI* (New England Biolabs, Ipswich MA).

25 Amplificações de marcadores de CAP foram realizadas em um reator de PCR com 20 µl utilizando a mistura Qiagen HotStart (Qiagen, Valencia CA) e 10 ng de DNA. As condições do ciclo térmico foram as mesmas descritas anteriormente. Quinze microlitros do produto de amplificação foram

utilizados para uma digestão de restrição (volume total de 100 µl) com a enzima de restrição 5-cortadora *TspRI*. A reação de restrição foi conduzida a 65 °C por uma hora. Os produtos de amplificação restritos foram extraídos uma vez em fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), precipitados em 100% etanol/3M acetato de sódio (2,5 vol: 1/10 vol), enxaguados em etanol a 70% e examinados sobre géis de agarose a 2%. Ao selecionar-se os dezessete recombinantes obtidos anteriormente com este conjunto de primers, foram encontrados sete breakpoints de recombinação, o que indica que está localizado em uma distância de 0,8 cM a partir do local *rum1* sobre o mesmo lado do marcador PHP9257A.

O marcador de tampa b0568n15 (primer frontal b0568n15 (SEQ ID Nº 15), primer reverso b0568n15 (SEQ ID Nº 16)) foi projetado com base na sequência BAC-terminal do clone BAC b0568n15, que está localizado acima no fluxo de UMC2274. Este conjunto de primers amplifica uma região de 706 bp, que exibe polimorfismo entre F7 e a linhagem antecedente mutante após restrição com a enzima 5-cortadora *TspRI*. Foram encontrados dois breakpoints de recombinação utilizando este conjunto de primers, o que indica que b0568n15 está localizado em uma distância de 0,2 cM do local *rum1* sobre o mesmo lado do marcador UMC2274.

O marcador de tampa MZA8828 (primer frontal MZA8828 (SEQ ID Nº 17), primer reverso MZA8828 (SEQ ID Nº 18)) foi projetado com base na sequência de MZA8828, que se encontra abaixo no fluxo de MZA8411. Este conjunto de primers amplifica uma região de 763 bp, que exibe polimorfismo entre F7 e a linhagem antecedente mutante após restrição com a enzima 5-cortadora *NciI* (New England Biolabs, Ipswich MA) a 37 °C). Um breakpoint de recombinação foi encontrado utilizando este conjunto de primers, o que indica que MZA8828 está localizado a uma distância de 0,1 cM do local *rum1* sobre o mesmo lado de MZA8411.

Amplificação por PCR demonstrou que o marcador MZA8828 está também localizado sobre o clone de BAC b0568n15. O local *RUM1* poderá ser estreitado, portanto, até a região genômica sobre o clone de Bac b0568n15 entre o marcador MZA8828 (em uma distância de 0,1 cM, um recombinante) e o marcador BAC-terminal b0568n15 (em uma distância de 0,2 cM, dois recombinantes).

## EXEMPLO 2

### IDENTIFICAÇÃO DO GENE *RUM1*:

O clone de BAC b0568n15, ao qual foi mapeado o local *rum1*, foi sequenciado. Com este propósito, DNA de BAC foi nebulizado utilizando gás nitrogênio sob alta pressão conforme descrito em Roe et al, 1996 (Roe et al (1996), *DNA Isolation and Sequencing*, John Wiley and Sons, Nova Iorque).

A região entre o marcador MZA8828 e o marcador BAC-terminal b0568n15 possui cerca de 69 kb de comprimento e compreende seis regiões gênicas de acordo com pesquisas de BLAST do BAC b0568n15 contra bancos de dados de EST de milho (bancos de dados de EST particulares da DuPont e públicos). Esta região também foi considerada sintênica com a região de cromossomo 1 de arroz: 27753126 a 27823073 bp por meio de pesquisa de homologia dos marcadores contra o banco de dados genômico de arroz. Dentre as seis regiões gênicas encontradas em milho, quatro foram também conservadas em arroz e anotadas como: Os01g0676200 (proteína hipotética conservada), Os01g675800 (proteína que contém domínio NAC), Os01g675700 (proteína similar a AA14/raiz solitária que reage a auxina (similar a IAA14/SLR)) e OS01g0675500 (proteína similar a UDO-glucoroniltransferase específica de glicoproteína).

O gene homólogo ao gene similar a IAA14/SLR de arroz foi selecionado como o mais forte candidato a ser o gene *RUM1* devido à sua localização com relação à distância dos marcadores MZA8828 e b0568n5 (1/3

e 2/3, respectivamente), bem como pela similaridade fenotípica entre o mutante *rum1* e *slr* de *Arabidopsis*, que também possui defeito na formação de raízes laterais (Fukaki et al, 2002). O fragmento com 4098 bp de b0568n15 que contém o gene *RUM1* é exibido em SEQ ID Nº 19 e na Fig. 1. A Fig. 2 exibe o  
5 mapa físico de *RUM1* e sua sintonia com arroz.

DNA extraído de B73-Mu, que conduz um alelo do tipo selvagem para *RUM1* (B73-Mu-wt) ou de plantas *rum1* e digerido com *XhoI* (Promega) foi examinado por meio de hibridização Southern utilizando um fragmento que compreende exons 1 e 2 do gene *RUM1* como sonda. Enquanto um fragmento  
10 com cerca de 700 bp segregava-se com DNA B73-Mu-wt, um fragmento com cerca de 1,8 kb segregava-se com plantas *rum1* mutantes, o que indica a inserção de um elemento exógeno nos mutantes. O elemento foi amplificado por meio de PCR e consistiu de um fragmento de 1719 bp com repetições invertidas terminais (TIRs) de 212 bp que exibem cerca de 85% de identidade  
15 com as TIRs do elemento transportável de milho *Mu1*.

RT-PCR de *RUM1* com RNA póli(A) extraído de B73-Mu-wt e raízes primárias de plantas *rum1* mutantes revelou que o transcrito de *rum1* era mais curto que o transcrito de B73-Mu-wt de *RUM1*.

### EXEMPLO 3

#### CLONAGEM DOS CDNAS DE *RUM1* E *RUM1* DE COMPRIMENTO TOTAL

Raízes primárias B73-Mu-wt e mudas irmãs *rum1* obtidas a partir da autoprole de uma planta heterozigótica foram utilizadas para extrair RNA total utilizando TRIzol® (Invitrogen®), que contém fenol e tiocianato de guanidina. Póli(A) mRNA foi purificado a partir de RNA total com um kit de  
25 purificação de mRNA obtido por meio da Amersham Biosciences/GE Healthcare, Piscataway NJ 08855, que consiste de colunas de fiação de oligo (dT)-celulose. Para realizar RT-PCR, foram utilizados 0,5 µg de póli(A) RNA para síntese de cDNA utilizando o sistema RT-PCR Thermoscript®

(Invitrogen®). O cDNA foi amplificado em seguida por meio de PCR utilizando a Taq DNA polimerase Platinum® combinada com Sistema Amplificador de PCR<sub>x</sub> (Invitrogen®). Os primers específicos para a 5' e 3' UTR de *RUM1* (primer frontal RUM1 -70F (SEQ ID N° 20), primer reverso RUM1 +40R (SEQ ID N° 21)) foram utilizados na reação de PCR. Produtos de PCR foram clonados no vetor nt pPCR®II-Topo® (Invitrogen®) e sequenciados para confirmar a identidade. Os cDNAs mutantes *RUM1* B73-Mu-wt e *rum1* são exibidos em SEQ ID N° 22 e 23, respectivamente. As sequências de aminoácidos correspondentes são exibidas em SEQ ID N° 24 e 25, respectivamente. O mutante possui uma exclusão de 72 nucleotídeos. A inserção de transposon em plantas *rum1* resulta, portanto, em uma divisão alternativa do transcrito de *RUM1* e, conseqüentemente, exclusão de 24 aminoácidos da sequência de proteína.

#### **EXEMPLO 4**

15 Identificação do cDNA de *RUM1* B73 de comprimento total:  
Utilizando BLAST N, a sequência do cDNA de *RUM1* de comprimento total (SEQ ID N° 22), obtida conforme descrito no Exemplo 3, foi utilizada para pesquisar ESTs no banco de dados EST público, que é derivado da linhagem congênita B73. A homologia mais alta encontrada foi para um EST parcial de B73 com o número de acesso CD439449 (SEQ ID N° 26). A proteína codificada por CD439449 é exibida em SEQ ID N° 27. O terminal 5' do cDNA de *RUM1* B73 (SEQ ID N° 26) foi deduzido a partir da sequência do clone de BAC público b0568n15 mencionado no Exemplo 3 (SEQ ID N° 19). A sequência de codificação de comprimento total de *RUM1* B73 é exibida em  
20 SEQ ID N° 28 e a sequência de aminoácidos correspondente, em SEQ ID N° 29. A sequência de aminoácidos de *RUM1* de B73 compartilha 99,3% de identidade com a sequência de *RUM1* do tipo selvagem da linhagem antecedente do mutante (B73-Mu-wt) e identidade de sequências de 39,8%,

38,6% e 33,5% com as proteínas de *Arabidopsis* IAA8 (Identificador Geral NCBI nº 15227275 (SEQ ID Nº 30), SLR/IAA14 (Identificador Geral NCBI nº 22328628, SEQ ID Nº 31) e MSG2/IAA19 (Identificador Geral NCBI nº 1532612, SEQ ID Nº 32), respectivamente. Demonstrou-se que MSG2/IAA19  
 5 está envolvido na regulação das reações de crescimento diferencial de hipocotiledôneas e formação de raízes laterais em *Arabidopsis thaliana* (Tatematsu et al, *Plant Cell*, fevereiro de 2004; 16 (2): 379-93).

Os cálculos de percentuais de identidade foram realizados utilizando o programa Megalign da suíte de computação bioinformática  
 10 LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison WI). Realizou-se alinhamento múltiplo das sequências utilizando o método de alinhamento Clustal V (Higgins e Sharp (1989), *CABIOS*. 5: 151-153) com os parâmetros padrão (PENALIDADE DE INTERVALO = 10, PENALIDADE DE COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10).

#### EXEMPLO 5

15 Padrão de expressão do gene *RUM1*:

O padrão de expressão de *RUM1* foi analisado por meio de Lynx MPSS (Brenner et al (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 1665-70). Marcas MPSS na sequência de cDNA de *RUM1* B73 foram pesquisadas utilizando o banco de dados LynxMPSS particular da DuPont. A expressão de  
 20 *RUM1* foi detectada em altos níveis em diversos tecidos, conforme resumido na Tabela 1 abaixo.

#### TABELA 1

##### MARCAS MPSS EM SEQUÊNCIA DE cDNA DE *RUM1* B73 (PPM = PARTES POR MILHÃO)

PPM	Tecido
229	meristema
221	embrião
164	muda

PPM	Tecido
154	cabelo
144	espiga
111	lã
110	raiz
99	folha
86	cultivo celular
70	pericarpo
55	semente
51	endosperma
46	verticilo
41	haste
41	pedicelo
40	casca
26	feixes vasculares
19	escutelo
19	haste

#### EXEMPLO 6

##### IDENTIFICAÇÃO NOVOS ALELOS MUTANTES DE *RUM1*:

Quatro linhagens de inserção de *Mutante* (*Mu*) independentes foram identificadas por meio da seleção das populações de TUSC ativas *Mu*:  
 5 PV04 47 E-04, PV03 103 E-03, PV03 128 B-04 e BT94 104 G-05. Vinte e cinco semanas de cada linhagem foram plantadas no campo Verão 2006 para gerar inserções homozigóticos por meio de autopolinização e também realizar introgressão da inserção na linhagem congênita B73.

DNA foi extraído de folhas das mudas que germinaram no campo  
 10 e a inserção foi confirmada por meio de PCR utilizando duas combinações de primers *RUM1* aninhados (conjunto 1: promotor frontal *RUM1* -354F (SEQ ID

Nº 33), primer reverso RUM1 exon1-R1 (SEQ ID Nº 34); conjunto 2: primer frontal RUM1 -132F (SEQ ID Nº 35), primer reverso RUM1 exon1-R2 (SEQ ID Nº 36)) e duas combinações de primers aninhados para *RUM1* e para o *Mu* TIR (conjunto 1: primer frontal RUM1 -354F (SEQ ID Nº 33), primer MuTIR (SEQ ID Nº 37); conjunto 2: primer frontal RUM1 -132F (SEQ ID Nº 35), primer MuTIR (SEQ ID Nº 37)).

A prole destas plantas será utilizada para análises do fenótipo das linhagens de inserção.

### EXEMPLO 7

#### IDENTIFICAÇÃO DO GENE DUPLICADO *RUM1 RUL*:

O cDNA de *RUM1* de B73 foi utilizado para pesquisar o banco de dados EST público em busca de genes *RUM1* de milho adicionais. Foi identificado um EST com número de acesso DR813588. As duas sequências compartilham identidade de sequências de 85,2%. A sequência de cDNA DR813588 foi utilizada para pesquisar sequências homólogas nos bancos de dados de DNA públicos e particulares. A homologia mais alta foi obtida com AZM5\_100875 a partir do Conjunto Genômico TIGR Versão 5.0. O cDNA previsto a partir de AZM5\_100875 demonstra cerca de 70% de identidade com o cDNA de *RUM1* de B73 e B73-Mu-wt. No nível de proteína, *RUM1* de B73 e B73-Mu-wt compartilham 84,6% de identidade com a proteína prevista codificada pela sequência de AZM5\_100875.

Recentemente, foi liberado um clone de BAC público que compreende a sequência AZM5\_100875. O clone de BAC c0491g17 (número de acesso AC187246) é mapeado fisicamente para o cromossomo 8 bin 5. Foram relatados padrões de duplicação de cromossomos entre os cromossomos 3 e 8 de milho (Gaut, B. S. (2001), *Genomic Research* 11, 55-66). Aparentemente, portanto, AZM5\_100875 codifica um gene duplicado de *RUM1*. A sequência de comprimento total da sequência duplicada de *RUM1* foi

montada a partir do alinhamento das sequências de cDNA de DR813588 e AZM5\_100875 e denominada *similar a Rum1 (RUL)*. A sequência de cDNA de comprimento total que codifica a proteína RUL é exibida em SEQ ID Nº 38 e a sequência de proteínas correspondente em SEQ ID Nº 39. Todos os alinhamentos de sequências e cálculos de percentual de identidade foram realizados utilizando o método de alinhamento Clustal.

### **EXEMPLO 8**

#### **CLONAGEM DO CDNA DE RUL DE COMPRIMENTO TOTAL:**

Os primers específicos para 5' e 3' UTR de *RUL* (primer frontal RUL -43F (SEQ ID Nº 40), primer reverso RUL +181R (SEQ ID Nº 41)) foram utilizados para amplificação por PCR do cDNA de comprimento total *RUL* (SEQ ID Nº 38) conforme descrito no Exemplo 3. Raízes primárias de mudas irmãs B73-Mu-wt e *rum1* obtidas a partir da prole autopolinizada de uma planta heterozigótica foram utilizadas como modelo. Produtos de PCR foram clonados no vetor pCRII-Topo obtido por meio da Invitrogen, Carlsbad CA 92008 e sequenciados para confirmar a identidade. Os transcritos de *RUL* derivados de irmãs do tipo selvagem (B73-Mu-wt) ou *rum1* foram idênticos, o que indica que o gene *RUL* não é alterado nos mutantes de *rum1*.

### **EXEMPLO 9**

#### **PREPARAÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO VEGETAL QUE CONTÉM UM GENE RUM1 OU SIMILAR A RUM1:**

Sequências homólogas ao gene *RUM1* podem ser identificadas utilizando algoritmos de comparação de sequências tais como BLAST (Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico; Altschul et al, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1993); vide também a explicação do algoritmo de BLAST no Web site do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas na Biblioteca Nacional de Medicina dos Institutos Nacionais de Saúde). O gene *RUM1* (SEQ ID Nº 22 ou 28) ou genes similares a *RUM1*, tais como o descrito em SEQ ID

Nº 38, podem ser amplificados por PCR por meio de qualquer dos métodos a seguir.

Método 1 (com base em RNA): com base nas informações de sequências 5' e 3' para a região de codificação de proteínas de *RUM1* (SEQ ID Nº 22 ou 28) ou um homólogo de *RUM1* (tal como *RUL*, SEQ ID Nº 38), podem ser projetados primers específicos de genes. RT-PCR pode ser utilizado com RNA vegetal para obter um fragmento de ácido nucleico que contém a região de codificação de proteína RUM1 ladeada por sequências attB1 (SEQ ID Nº 42) e attB2 (SEQ ID Nº 43). O primer pode conter uma sequência Kozak de consenso (CAACA) acima no fluxo do códon de início.

Método 2 (com base em DNA): alternativamente, o inserto de cDNA completo (que contém regiões não codificadoras 5' e 3') de um clone que codifica RUM1 ou um homólogo de polipeptídeo (tal como *RUL*, SEQ ID Nº 38) pode ser amplificado por meio de PCR. Podem ser projetados primers frontais e reversos que contêm a sequência attB1 e sequência específica de vetores que precede o inserto de cDNA ou a sequência attB2 e sequência específica de vetores que se segue ao inserto de cDNA, respectivamente. Para um inserto de cDNA clonado no vetor pBluescript SK+, podem ser utilizados o primer frontal VC062 (SEQ ID Nº 44) e o primer reverso VC063 (SEQ ID Nº 45).

Os métodos 1 e 2 podem ser modificados de acordo com procedimentos conhecidos dos técnicos no assunto. Os primers do método 1 podem conter, por exemplo, locais de restrição em vez de locais attB1 e attB2, para clonagem subsequente do produto de PCR em um vetor que contém locais attB1 e attB2. Além disso, o método 2 pode envolver a amplificação de um clone de cDNA, um clone lambda, um clone de BAC ou DNA genômico.

Um produto de PCR obtido por meio de qualquer método acima pode ser combinado com o vetor doador Gateway®, tal como pDONR®/Zeo (Invitrogen®, Fig. 3; SEQ ID Nº 46) ou pDONR® 221 (Invitrogen®, Figura 4;

SEQ ID N° 47) utilizando uma Reação de Recombinação BP. Este processo remove o gene *ccdB* letal bacteriano, bem como o gene de resistência a cloranfenicol (CAM) dos vetores doadores e clona direcionalmente o produto de PCR com os locais *attB1* e *attB2* laterais para criar um clone de entrada.

5 Utilizando a tecnologia Invitrogen Gateway® Clonase®, o gene *RUM1* ou similar a *RUM1* do clone de entrada pode ser transferido em seguida para um vetor de destino apropriado para obter um vetor de expressão vegetal para uso com soja e milho, tal como PHP27840 (Fig. 5; SEQ ID N° 48) ou PHP23236 (Figura 6; SEQ ID N° 49), respectivamente.

10 Alternativamente, pode ser realizada uma reação de recombinação MultiSite Gateway® LR entre diversos clones de entrada e um vetor de destino apropriado para criar um vetor de expressão. Um Exemplo deste tipo de reação é descrito no Exemplo 14, que descreve a construção de vetores de expressão de milho para transformação de linhagens de milho.

15

#### EXEMPLO 10

#### PREPARAÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO DE SOJA E TRANSFORMAÇÃO DE SOJA COM

#### O GENE *RUM1*:

Plantas de soja podem ser transformadas para sobre-expressar as sequências de *RUM1* e similares a *RUM1*, a fim de examinar o fenótipo resultante.

20

Os clones de entrada descritos no Exemplo 9 podem ser utilizados para clonar direcionalmente cada gene em um vetor PHP27840 (Figura 5, SEQ ID N° 48), de tal forma que a expressão do gene esteja sob o controle do promotor SCP1.

25

Embriões de soja podem ser transformados em seguida com o vetor de expressão que compreende sequências que codificam os polipeptídeos do presente.

Para induzir embriões somáticos, cotilédones com 3 a 5 mm de

comprimento dissecados a partir de sementes imaturas esterilizadas na superfície do cultivo de soja A2872 podem ser cultivados na luz ou no escuro a 26 °C sobre um meio Agar apropriado por seis a dez semanas. Embriões somáticos, que produzem embriões secundários, são extirpados em seguida e colocados em um meio líquido apropriado. Após a seleção repetida de conjuntos de embriões somáticos que se multiplicam na forma de embriões precoces em estágio globular, as suspensões são mantidas conforme descrito abaixo.

Cultivos de suspensão embriogênica de soja podem ser mantidos em 35 ml de meios líquidos em um agitador giratório, 150 rpm, a 26 °C com luzes fluorescentes em um programa de 16:8 horas de dia e noite. Os cultivos são subcultivados a cada duas semanas por meio de inoculação de cerca de 35 mg de tecido em 35 ml de meio líquido. Cultivos de suspensão embriogênica de soja podem ser transformados em seguida por meio do método de bombardeamento de disparador de partículas (Klein et al (1987), *Nature (London)* 327: 70-73, Patente Norte-Americana nº 4.945.050). Um instrumento DuPont Biolistic® PDS1000/He (retroajuste de hélio) pode ser utilizado para essas transformações.

Um gene marcador selecionável que pode ser utilizado para facilitar a transformação de soja é um gene quimérico composto do promotor 35S de vírus mosaico da couve-flor (Odell et al (1985), *Nature* 313: 810-812), o gene higromicina fosfotransferase do plasmídeo pJR225 (de *E. coli*; Gritz et al (1983), *Gene* 25: 179-188) e a região 3' do gene nopalina sintase do T-DNA do plasmídeo de Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Um outro gene marcador selecionável que pode ser utilizado para facilitar a transformação de soja é um gene acetolactato sintase (ALS) resistente a herbicidas de soja ou *Arabidopsis*. ALS é a primeira enzima comum na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. Foram identificadas mutações em ALS

que conferem resistência a algumas ou a todas as três classes de inibidores de ALS (Patente Norte-Americana nº 5.013.659; cujo teor integral é incorporado ao presente como referência). A expressão do gene ALS resistente a herbicidas pode ser controlada por um promotor de SAM sintetase (Pedido de Patente 5 Norte-Americano nº US-2003-0226166-A1; cujo teor integral é incorporado ao presente como referência).

A 50 µl de uma suspensão de partículas de ouro de 1 µm a 60 mg/ml, adiciona-se (pela ordem): 5 µl de DNA (1 µg/µl), 20 µl de espermidina (0,1 M) e 50 µl de CaCl<sub>2</sub> (2,5 M). A preparação de partículas é agitada em seguida por três minutos, centrifugada em um microcentrifugador por dez 10 segundos e o sobrenadante é removido. As partículas revestidas com DNA são lavadas em seguida por uma vez em 400 µl de etanol a 70% e novamente suspensas em 40 µl de etanol anidro. A suspensão de DNA e partículas pode ser sonicada três vezes por um segundo cada. Cinco microlitros das partículas 15 de ouro revestidas com DNA são carregados em seguida sobre cada disco macro veículo.

Cerca de 300 a 400 mg de um cultivo de suspensão com duas semanas de idade são colocados em uma placa petri de 60 x 15 mm vazia e o líquido residual é removido do tecido com uma pipeta. Para cada experimento 20 de transformação, são normalmente bombardeadas cerca de cinco a dez placas de tecido. A pressão de ruptura de membrana é definida em 1100 psi e a câmara é evacuada até um vácuo de 711 mmHg. O tecido é colocado a cerca de 8,9 cm de distância da tela de retenção e bombardeado por três vezes. Após o bombardeamento, o tecido pode ser dividido ao meio, colocado de volta 25 no líquido e cultivado conforme descrito acima.

Cinco a sete dias após o bombardeamento, os meios líquidos podem ser substituídos por meios novos e, onze a doze dias após o bombardeamento, por meios novos que contêm 50 mg/ml de higromicina.

Estes meios seletivos podem ser renovados semanalmente. Sete a oito semanas após o bombardeamento, pode-se observar o crescimento de tecido verde transformado a partir de conjuntos embriogênicos necróticos não transformados. Tecido verde isolado é removido e inoculado em frascos individuais para gerar novos cultivos de suspensão embriogênica transformados e propagados de forma clonal. Cada linhagem nova pode ser tratada como um evento de transformação independente. Essas suspensões podem ser subcultivadas em seguida e mantidas na forma de conjuntos de embriões imaturos ou regeneradas em plantas inteiras por meio de maturação e germinação de embriões somáticos individuais.

A arquitetura de raiz aprimorada pode ser medida em soja por meio de cultivo das plantas em solo e lavagem das raízes antes da análise da massa total de raízes com o software WinRHIZO® (Regent Instruments, Inc.), um sistema de análise de imagens projetado especificamente para medição de raízes. WinRHIZO® utiliza o contraste em pixels para diferenciar a raiz clara do fundo mais escuro.

Plantas de soja transformadas com o gene *RUM1* podem ser testadas em seguida para estudar características agronômicas relativas a plantas controle ou de referência, tais como eficácia na utilização de nitrogênio, aumento do rendimento e/ou estabilidade sob diversas condições ambientais (como condições de limitação de nitrogênio, seca etc.).

### **EXEMPLO 11**

#### **TRANSFORMAÇÃO DE MILHO COM O GENE *RUM1* E SIMILAR A *RUM1* UTILIZANDO**

##### **BOMBARDEAMENTO DE PARTÍCULAS:**

Plantas de milho podem ser transformadas para sobre-expressar *RUM1* e genes similares a *RUM1*, a fim de examinar o fenótipo resultante.

Os clones de entrada Gateway® descritos no Exemplo 9 podem ser utilizados para clonar de forma direcional cada gene em um vetor de

transformação de milho. A expressão do gene em milho pode estar sob o controle de um promotor constitutivo tal como o promotor de ubiquitina de milho (Christensen et al, *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632 (1989) e Christensen et al, *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689 (1992)).

5                   A construção de DNA recombinante descrita acima pode ser introduzida em seguida em células de milho por meio do procedimento a seguir. Embriões de milho imaturos podem ser dissecados a partir de cariopses em desenvolvimento derivadas de cruzamentos das linhagens de milho congênicas H99 e LH132. Os embriões são isolados dez a onze dias após a  
10                   polinização quando possuírem de 1,0 a 1,5 mm de comprimento. Os embriões são colocados em seguida com o lado do eixo voltado para baixo e em contato com meio N6 solidificado com agarose (Chu et al, *Sci. Sin. Peking* 18: 659-668 (1975)). Os embriões são mantidos no escuro a 27 °C. Calo embriogênico quebradiço que consiste de massas não diferenciadas de células com pró-  
15                   embrioides somáticos e embrioides contidos em estruturas de suspensão prolifera-se a partir do escutelo desses embriões imaturos. O calo embriogênico isolado a partir do explante primário pode ser cultivado sobre meio N6 e subcultivado sobre este meio a cada duas a três semanas.

                  O plasmídeo, p35S/Ac (obtido por meio do Dr. Peter Eckes,  
20                   Hoechst Ag, Frankfurt, Alemanha), pode ser utilizado em experimentos de transformação, a fim de proporcionar um marcador selecionável. Esse plasmídeo contém o gene *pat* (vide Patente Européia nº 0.242.236), que codifica acetil transferase de fosfotricina (PAT). A enzima PAT confere resistência a inibidores de sintetase de glutamina herbicidas, tais como  
25                   fosfotricina. O gene *pat* em p35S/Ac está sob o controle do promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor (Odell et al, *Nature* 313: 810-812 (1985)) e a região 3' do gene nopalino sintase a partir do T-DNA do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

O método de bombardeamento de partículas (Klein et al, *Nature* 327: 70-73 (1987)) pode ser utilizado para transferir genes para as células de cultivo de calo. De acordo com esse método, partículas de ouro (com diâmetro de 1  $\mu\text{m}$ ) são revestidas com DNA utilizando a técnica a seguir. Dez  $\mu\text{g}$  de DNAs de plasmídeo são adicionados a 50  $\mu\text{l}$  de uma suspensão de partículas de ouro (60 mg por ml). São adicionados cloreto de cálcio (50  $\mu\text{l}$  de uma solução de 2,5 M) e base livre de espermidina (20  $\mu\text{l}$  de uma solução de 1,0 M) às partículas. A suspensão é turbilhonada durante a adição dessas soluções. Após dez minutos, os tubos são rapidamente centrifugados (5 seg a 15.000 rpm) e o sobrenadante é removido. As partículas são novamente suspensas em 200  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto, novamente centrifugadas e o sobrenadante é removido. O enxágue com etanol é realizado novamente e as partículas são novamente suspensas em um volume final de 30  $\mu\text{l}$  de etanol. Uma parcela (5  $\mu\text{l}$ ) das partículas de ouro revestidas com DNA pode ser colocada no centro de um disco suspenso Kapton® (Bio-Rad Labs). As partículas são então aceleradas no tecido de milho com um Biolistic® PDS-1000/He (Bio-Rad Instruments, Hercules CA, Estados Unidos), utilizando pressão de hélio de 1000 psi, distância de lacuna de 0,5 cm e distância aérea de 1,0 cm.

Para o bombardeamento, o tecido embriogênico é colocado sobre papel-filtro sobre meio N6 solidificado com agarose. O tecido é disposto na forma de tecido fino e cobriu uma área circular de cerca de 5 cm de diâmetro. A placa petri que contém o tecido pode ser colocada na câmara do PDS-1000/He a cerca de 8 cm da tela de vedação. O ar da câmara é evacuado em seguida até um vácuo de 711 milímetros de Hg. O macroveículo é acelerado com uma onda de choque de hélio, utilizando uma membrana de ruptura que se rompe quando a pressão de He no tubo de choque atinge 1000 psi.

Sete dias após o bombardeamento, o tecido pode ser transferido para meio N6 contendo bialafós (5 mg por litro) e que não contenha caseína ou

prolina. O tecido continua a crescer lentamente sobre esse meio. Após duas semanas adicionais, o tecido pode ser transferido para meio N6 novo contendo bialofós. Após seis semanas, podem ser identificadas áreas de cerca de 1 cm de diâmetro com cultivo ativo de calos sobre algumas das placas que contêm o meio suplementado por bialafós. Esses calos podem continuar a crescer quando subcultivados sobre o meio seletivo.

As plantas podem ser regeneradas a partir do calo transgênico, transferindo-se em primeiro lugar conjuntos de tecido para meio N6 suplementado com 0,2 mg de 2,4-D por litro. Após duas semanas, o tecido pode ser transferido para meio de regeneração (Fromm et al, *Bio/Technology* 8: 833-839 (1990)). Plantas transgênicas T0 podem ser regeneradas e o seu fenótipo determinado seguindo procedimentos HTP. Podem ser recolhidas sementes T1.

Plantas T1 podem ser cultivadas e analisadas para determinar alterações fenotípicas. Os parâmetros a seguir podem ser quantificados utilizando análise de imagem: área da planta, volume, velocidade de crescimento e análise de coloração podem ser recolhidas e quantificadas. As construções de expressão que resultam em uma alteração da arquitetura de raiz em comparação com plantas controle apropriadas podem ser consideradas uma prova de que o gene *RUM1* funciona em milho para alterar a arquitetura de raiz.

Além disso, uma construção de DNA recombinante que contém o gene *RUM1* pode ser introduzida em uma linhagem de milho por meio de transformação direta ou introgressão a partir de uma linhagem transformada separadamente.

Plantas transgênicas, sejam elas congênicas ou híbridas, podem sofrer experimentos de campo mais vigorosos para estudar aumento do rendimento e/ou resistência à fixação das raízes sob diversas condições

ambientais (tais como variações da disponibilidade de nutrientes e água).

Pode-se também realizar análise de rendimento subsequente para determinar se as plantas que contêm o gene *RUM1* possuem um aumento do desempenho de rendimento, em comparação com as plantas controle (ou de referência) que não contêm o gene *RUM1*. As plantas que contêm o gene *RUM1* possuiriam menos perda de rendimento com relação às plantas controle, preferencialmente perda de rendimento de 50%, ou possuiriam aumento de rendimento com relação às plantas controle sob condições ambientais variáveis.

10

### EXEMPLO 12

#### ELETROPORAÇÃO DE *AGROBACTERIUM* LBA4404:

Células competentes por eletroporação (40 µl), tais como LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (que contém PHP10523, Fig. 7, SEQ ID Nº 50), são descongeladas sobre gelo (vinte a trinta minutos). PHP10523 contém genes VIR para transferência de T-DNA, uma origem de reprodução de plasmídeo com baixo número de cópias de *Agrobacterium*, um gene de resistência a tetraciclina e um local *cos* para recombinação biomolecular de DNA *in vivo*. Enquanto isso, a cubeta de eletroporação é resfriada sobre gelo. As configurações do eletroporador são ajustadas em 2,1 kV. Uma parcela de DNA parental (0,5 µl de JT (US 7.087.812) sob concentração de 0,2 µg a 1,0 µg em tampão com baixo teor de sal ou H<sub>2</sub>O destilada duas vezes) é misturada com as células de *Agrobacterium* descongeladas ainda sobre gelo. A mistura é transferida para o fundo da cubeta de eletroporação e mantida em repouso sobre gelo por um a dois minutos. As células são eletroporadas (eletroporador Eppendorf 2510) pressionando-se a tecla "Pulso" duas vezes (atingindo idealmente um pulso de 4,0 msec). Em seguida, são adicionados 0,5 ml de meio 2xYT (ou meio SOC) à cubeta e transferidos para um tubo Falcon de 15 ml. As células são incubadas a 28-30 °C, 200-250 rpm por três horas.

Parcelas de 250 µl são espalhadas sobre placas nº 30B (YM + 50 µg/ml de espectinomicina) e incubadas por três dias a 28-30 °C. Para aumentar o número de transformadores, pode-se realizar uma dentre duas etapas opcionais:

5 Opção 1: sobrepor placas com 30 µl de 15 mg/ml de Rifampicina. LBA4404 possui um gene de resistência cromossômica para Rifampicina. Esta seleção adicional elimina algumas colônias contaminantes observadas ao utilizar preparações mais fracas de células competentes para LBA4404.

Opção 2: realizar duas réplicas da eletroporação para compensar  
10 células eletrocompetentes mais fracas.

#### IDENTIFICAÇÃO DE TRANSFORMADORES:

Quatro colônias independentes são tomadas e riscadas sobre meio mínimo AB mais 50 mg/ml de placas de espectinomicina (meio nº 12S) para isolamento de colônias. As placas são incubadas a 28 °C por dois a três  
15 dias.

Uma única colônia para cada suposto cointegrado é tomada e inoculada com 4 ml de nº 60A com 50 mg/l de espectinomicina. A mistura é incubada por 24 horas a 28 °C com agitação. DNA de plasmídeo de 4 ml de cultivo é isolado utilizando Qiagen Miniprep + lavagem com PB opcional. O  
20 DNA é eluído em 30 µl. Parcelas de 2 µl são utilizadas para eletroporação de 20 µl de DH10b + 20 µl de ddH<sub>2</sub>O conforme acima.

Opcionalmente, pode-se utilizar uma parcela de 15 µl para transformar 75 a 100 µl de Eficiência de Biblioteca Invitrogen DH5α. As células são espalhadas sobre meio LB mais 50 mg/ml de placas de espectinomicina  
25 (meio nº 34T) e incubadas a 37 °C por uma noite.

Três a quatro colônias independentes são tomadas para cada suposto cointegrado e são inoculados 4 ml de 2xYT (nº 60A) com 50 µg/ml de espectinomicina. As células são incubadas a 37 °C por uma noite com

agitação.

DNA de plasmídeo isolado de 4 ml de cultivo utilizando Miniprep QIAprep® com lavagem com PB opcional (eluir em 50 µl). Utilize 8 µl para digestão com Sall (utilizando JT parental e PHP10523 como controles).

5 São realizadas mais três digestões utilizando enzimas de restrição BamHI, EcoRI e HindIII para quatro plasmídeos que representam dois supostos cointegrados com padrão de digestão de Sall correto (utilizando DNA parental e PHP 10523 como controles). Géis eletrônicos são recomendados para comparação.

10 Alternativamente, para aplicações de alto rendimento, tal como descrito para Linhagens de Milho Derivadas de Milho Duro Gaspe Bay (Exemplos 16 a 18), em vez de avaliar os vetores cointegrados resultantes por meio de análise de restrição, podem ser utilizadas simultaneamente três colônias para a etapa de infecção conforme descrito no Exemplo 13.

15

### EXEMPLO 13

#### TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *AGROBACTERIUM* EM MILHO:

Plantas de milho podem ser transformadas para sobre-expressar *RUM1* e *RUL*, a fim de examinar o fenótipo resultante.

20 A transformação de milho mediada por *Agrobacterium* é realizada essencialmente conforme descrito por Zhao et al em *Meth. Mol. Biol.* 318: 315-323 (2006) (vide também Zhao et al, *Mol. Breed.* 8: 323-333 (2001) e Patente Norte-Americana nº 5.981.840, emitida em nove de novembro de 1999, incorporada ao presente como referência). O processo de transformação envolve a inoculação de bactérias, cocultivo, repouso, seleção e regeneração  
25 de plantas.

#### 1. PREPARAÇÃO DE EMBRIÕES IMATUROS:

Os embriões imaturos são dissecados a partir de cariopses e colocados em um microtubo de 2 ml contendo 2 ml de meio PHI-A.

## **2. INFECÇÃO POR *AGROBACTERIUM* E COCULTIVO DE EMBRIÕES:**

### **2.1 ETAPA DE INFECÇÃO:**

Meio PHI-A é removido com uma micropipeta de 1 ml e adiciona-se 1 ml de suspensão de *Agrobacterium*. O tubo é suavemente invertido para  
5 mistura. A mistura é incubada por cinco minutos à temperatura ambiente.

### **2.2 ETAPA DE COCULTIVO:**

A suspensão de *Agrobacterium* é removida da etapa de infecção com uma micropipeta de 1 ml. Utilizando uma espátula estéril, os embriões são raspados do tubo e transferidos para uma placa de meio PHI-B em uma placa  
10 Petri de 100 x 15 mm. Os embriões são orientados com o eixo embriônico para baixo sobre a superfície do meio. Placas com os embriões são cultivadas a 20 °C no escuro por três dias. Pode-se utilizar L-cisteína na fase de cocultivo. Com o vetor binário padrão, o meio de cocultivo que recebeu 100 a 400 mg/l de L-cisteína é crítico para a recuperação de eventos transgênicos estáveis.

## **3. SELEÇÃO DE SUPOSTOS EVENTOS TRANSGÊNICOS:**

Para cada placa de meio PHI-D em uma placa Petri de 100 x 15 mm, são transferidos dez embriões, mantendo-se a orientação, e as placas são vedadas com Parafilm. As placas são incubadas no escuro a 28 °C. Espera-se que supostos eventos de crescimento ativo, tais como tecido embriônico  
20 amarelo claro, sejam visíveis em seis a oito semanas. Embriões que não produzem eventos podem ser marrons e necróticos e pouco crescimento de tecido quebradiço é evidente. Suposto tecido embriônico transgênico é subcultivado em placas PHI-D novas em intervalos de duas a três semanas, dependendo da velocidade de crescimento. Os eventos são registrados.

## **4. REGENERAÇÃO DE PLANTAS T0:**

Tecido embriônico propagado sobre meio PHI-D é subcultivado em meio PHI-E (meio de maturação de embriões somáticos) em placas Petri 100 x 25 mm e incubado a 28 °C, no escuro, até o amadurecimento dos  
25

embriões somáticos, por cerca de dez a dezoito dias. Embriões somáticos amadurecidos individuais com coleótilo e escutelo bem definidos são transferidos para meio de germinação de embriões PHI-F e incubados a 28 °C na luz (cerca de 80 µE de lâmpadas fluorescentes brancas frias ou equivalentes). Em sete a dez dias, plantas regeneradas, com cerca de 10 cm de altura, são colocadas em vasos em mistura de horticultura e endurecidas utilizando métodos de horticultura padrão.

#### **MEIOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS:**

1. PHI-A: 4 g/l de sais basais de CHU, 1,0 ml/l de mistura de vitamina de Eriksson 1000X, 0,5 mg/l de tiamina HCl, 1,5 mg/l de 2,4-D, 0,69 g/l de L-prolina, 68,5 g/l de sacarose, 36 g/l de glicose, pH 5,2. Adicione 100 µM de acetossiringona, esterilizada por filtração antes do uso.

2. PHI-B: PHI-A sem glicose com aumento de 2,4-D para 2 mg/l, redução de sacarose para 30 g/l e suplementação com 0,85 mg/l de nitrato de prata (esterilizado por filtração), 3,0 g/l de gelrita, 100 µM de acetossiringona (esterilizada por filtração), 5,8.

3. PHI-C: PHI-B sem gelrita e acetossiringona, com redução de 2,4-D para 1,5 mg/l e suplementação com 8,0 g/l de Agar, 0,5 g/l de tampão MS-ácido morfolino etano sulfônico (MES) e 100 mg/l de carbenicilina (esterilizada por filtração).

4. PHI-D: PHI-C suplementado com 3 mg/l de bialafós (esterilizado por filtração).

5. PHI-E: 4,3 g/l de sais de Murashige e Skoog (MS) (Gibco, BRL 11117-074), 0,5 mg/l de ácido nicotínico, 0,1 mg/l de tiamina HCl, 0,5 mg/l de piridoxina HCl, 2,0 mg/l de glicina, 0,1 g/l de mioinositol, 0,5 mg/l de zeatina (Sigma, cat. nº Z-0164), 1 mg/l de ácido indol acético (IAA), 26,4 µg/l de ácido abscísico (ABA), 60 g/l de sacarose, 3 mg/l de bialafós (esterilizado por filtração), 100 mg/l de carbenicilina (esterilizado por filtração), 8 g/l de Agar,

pH 5,6.

6. PHI-F: PHI-E sem zeatina, IAA, ABA; sacarose reduzida para 40 g/l; substituição de Agar com 1,5 g/l de gelrita; pH 5,6.

As plantas podem ser regeneradas a partir do calo transgênico por meio da transferência, em primeiro lugar, de conjuntos de tecido para meio N6 suplementado com 0,2 mg por litro de 2,4-D. Após duas semanas, o tecido pode ser transferido para meio de regeneração (Fromm et al (1990), *Bio/Technology* 8: 833-839). Pode ser realizada análise fenotípica de plantas T0 e plantas T1 transgênicas.

As plantas T1 podem ser analisadas para determinar alterações fenotípicas. Utilizando análise de imagens, as plantas T1 podem ser analisadas para determinar alterações fenotípicas na área, volume e velocidade de crescimento da planta e a análise de coloração pode ser realizada diversas vezes durante o crescimento das plantas. A alteração da arquitetura de raiz pode ser determinada conforme descrito no Exemplo 21.

Análise subsequente de alterações das características agronômicas pode ser realizada para determinar se as plantas que contêm o gene *RUM1* ou *RUL* possuem uma melhoria de pelo menos uma característica agronômica, em comparação com as plantas controle (ou de referência) que não contêm o gene *RUM1* ou *RUL*. As alterações podem também ser estudadas sob diversas condições ambientais.

#### **EXEMPLO 14**

##### **CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO DE MILHO COM O GENE *RUM1* E *RUL***

##### **UTILIZANDO TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *AGROBACTERIUM*:**

Podem ser preparados vetores de expressão de milho com os genes *RUM1* (SEQ ID Nº 22 ou 28 e genes *similares a RUM1* (tais como *RUL*, SEQ ID Nº 38) sob o controle do promotor NAS2 (SEQ ID Nº 51), GOS 2 (SEQ ID Nº 52) ou Ubiquitina (UBI1ZM; SEQ ID Nº 53). PINII é o terminal (SEQ ID Nº

54). Utilizando a tecnologia Gateway® da Invitrogen®, o clone de entrada, criado conforme descrito no Exemplo 9, que contém o gene *RUM1* de milho ou o gene *RUL* de milho, pode ser utilizado em reações Gateway® LR separadas com:

5                   1.       O clone de entrada do promotor GOS2 de milho constitutivo PHP28408 (Fig. 8, SEQ ID N° 55) e o clone de entrada do terminal PinII PHP20234 (Fig. 9, SEQ ID N° 56) no vetor de destino PHP28529 (Fig. 10, SEQ ID N° 57).

10                   2.       O clone de entrada do promotor NAS2 de milho de raiz PHP 22020 (Fig. 11, SEQ ID N° 58) e o clone de entrada de Término de PinII PHP20234 (Fig. 9, SEQ ID N° 56) no vetor de destino PHP28529 (Fig. 10, SEQ ID N° 57).

15                   3.       O clone de entrada do promotor UBI 1ZM de milho constitutivo PHP23112 (Fig. 12, SEQ ID N° 59) e o clone de entrada do terminal PinII PHP20234 (Fig. 9, SEQ ID N° 56) no vetor de destino PHP28529 (Fig. 10, SEQ ID N° 57). O vetor de destino PHP28529 também adiciona a cada um dos vetores finais um:

                    1.       Conjunto de promotor RD29A::proteína fluorescente amarela::terminal PinII para seleção de sementes de *Arabidopsis*.

20                   2.       Conjunto de promotor de ubiquitina::fusão de proteína fluorescente vermelha/moPAT::terminal PinII para seleção de transformação e seleção de sementes de *Z. mays*.

25                   Além do promotor GOS2 ou NAS2, outros promotores, tais como, mas sem limitações, o promotor S2A e S2B, o promotor ROOTMET2 de milho, o Cyclo de milho, o CR1BIO, o CRWAQ81 e o ZRP2.4447 de milho são úteis para dirigir a expressão de genes *RUM1* e *similares a RUM1* em milho. Além disso, uma série de terminais, tais como, mas sem limitações, o terminal PINII, poderá ser utilizada para atingir a expressão do gene de interesse em milho.

**EXEMPLO 15****TRANSFORMAÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO COM GENES *RUM1* E SIMILARES A *RUM1*****UTILIZANDO TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *AGROBACTERIUM*:**

Os vetores finais (Exemplo 14) podem ser eletroporados  
5 separadamente em seguida em *Agrobacterium* LBA4404 que contém  
PHP10523 (Figura 7; SEQ ID N° 50, Komari et al, *Plant J.* 10: 165-174 (1996),  
NCBI GI: 59797027) para criar os vetores cointegrados para transformação de  
milho. Os vetores cointegrados são formados por meio de recombinação dos  
10 vetores finais (vetores de expressão de milho) com PHP10523, por meio dos  
locais de recombinação de COS contidos em cada vetor. Os vetores  
cointegrados também contêm, além dos conjuntos de expressão descritos no  
Exemplo 14, genes necessários para a linhagem de *Agrobacterium* e a  
transformação mediada por *Agrobacterium* (TET, TET, TRFA, terminal ORI,  
CTL, ORI V, VIR C1, VIR C2, VIR G, VIR B). A transformação em uma  
15 linhagem de milho pode ser realizada conforme descrito no Exemplo 13.

**EXEMPLO 16****PREPARAÇÃO DOS VETORES DE DESTINO PHP23236 E PHP29635 PARA****TRANSFORMAÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO DERIVADAS DE MILHO DURO GASPE BAY:**

O vetor de destino PHP23236 (Fig. 6, SEQ ID N° 49) foi obtido por  
20 meio de transformação de linhagem de *Agrobacterium* LBA4404 que contém o  
plasmídeo PHP10523 (Fig. 7, SEQ ID N° 50) com o plasmídeo PHP23235 (Fig.  
13, SEQ ID N° 60) e isolamento do produto de cointegração resultante. O vetor  
de destino PHP23236 pode ser utilizado em uma reação de recombinação com  
um clone de entrada conforme descrito no Exemplo 9 para criar um vetor de  
25 expressão de milho para transformação de linhagens de milho derivadas de  
milho duro Gaspé Bay. A expressão do gene de interesse encontra-se sob o  
controle do promotor de ubiquitina (SEQ ID N° 53).

PHP29635 (Fig. 14, SEQ ID N° 61) foi obtido por meio de

transformação de linhagem de *Agrobacterium* LBA4404 que contém o plasmídeo PHP10523 com o plasmídeo PIIOXS2a-FRT87 (ni)m (Fig. 15, SEQ ID N° 62) e isolamento do produto de cointegração resultante. O vetor de destino PHP29635 pode ser utilizado em uma reação de recombinação com um clone de entrada conforme descrito no Exemplo 9 para criar um vetor de expressão de milho para transformação de linhagens de milho derivadas de milho duro Gaspé Bay. A expressão do gene de interesse encontra-se sob o controle do promotor S2A (SEQ ID N° 63).

#### **EXEMPLO 17**

##### **PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS QUE CONTÊM GENES *RUM1* OU *RUL* PARA TRANSFORMAÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO DERIVADAS DE MILHO DURO GASPE BAY:**

Utilizando tecnologia de recombinação Gateway® da Invitrogen, podem ser criados clones de entrada que contêm os genes *RUM1* ou similares a *RUM1*, conforme descrito no Exemplo 9 e utilizado para clonar direcionalmente cada gene no vetor de destino PHP23236 (Exemplo 16) para expressão sob o promotor de ubiquitina ou no vetor de destino PHP29635 (Exemplo 16) para expressão sob o promotor S2A. Cada um dos vetores de expressão são vetores binários de T-DNA para transformação mediada por *Agrobacterium* em milho.

As linhagens de milho derivadas de milho duro Gaspé Bay podem ser transformadas com os vetores de expressão conforme descrito no Exemplo 18.

#### **EXEMPLO 18**

##### **TRANSFORMAÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO DERIVADAS DE MILHO DURO GASPE BAY COM GENES *RUM1* E SIMILARES A *RUM1*:**

Plantas de milho podem ser transformadas para sobre-expressar *RUM1* e genes similares a *RUM1*, a fim de examinar o fenótipo resultante.

**PLANTAS RECEPTORAS:**

Células de plantas receptoras podem ser de uma linhagem de milho uniforme que possui um ciclo de vida curto ("ciclização rápida"), tamanho reduzido e alto potencial de transformação. São típicas dessas células vegetais para milho as células de plantas de qualquer uma das variedades de linhagem de milho duro Gaspe Bay (GBF) disponíveis ao público. Uma possível variedade de linhagem de planta é o híbrido F1 de GBF x QTM (Milho de Produção Rápida, uma forma disponível ao público de milho duro Gaspe Bay selecionado para crescimento sob condições de estufa) descrito em Tomes et al, Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0221212. As plantas transgênicas obtidas a partir desta linhagem são de tamanho tão reduzido que podem crescer em vasos de 10 cm (1/4 do espaço necessário para uma planta de milho com tamanho normal) e amadurecer em menos de 2,5 meses (tradicionalmente, são necessários 3,5 meses para obter semente T0 transgênica, pois as plantas transgênicas são aclimatadas na estufa). Uma outra linhagem apropriada é uma linhagem haploide dupla de GS3 (linhagem altamente transformável) x milho duro Gaspe. Ainda outra linhagem apropriada é uma linhagem congênita de elite transformável que conduz um transgene que causa florescência precoce, estatura reduzida ou ambos.

20

**PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO:**

Pode ser utilizado qualquer método apropriado de introdução dos transgenes nas células de milho, incluindo, mas sem limitações, procedimentos do tipo de inoculação utilizando vetores com base em *Agrobacterium* conforme descrito no Exemplo 17. A transformação pode ser realizada sobre embriões imaturos da planta receptora (alvo).

25

**CRESCIMENTO DE PRECISÃO E RASTREAMENTO DE PLANTAS:**

A população de eventos de plantas transgênicas (T0) resultante dos embriões de milho transformados é cultivada em um ambiente de estufa

controlado utilizando um projeto de bloco aleatorizado para reduzir ou eliminar erros ambientais. Um projeto de bloco aleatorizado é uma disposição de planta na qual as plantas experimentais são divididas em grupos (tais como trinta plantas por grupo), designados como blocos, e cada planta é atribuída aleatoriamente a um local com o bloco.

Para um grupo de trinta plantas, vinte e quatro plantas experimentais transformadas e seis plantas controle (plantas com um fenótipo definido) (coletivamente, um "grupo de réplica") são colocadas em vasos que são dispostos em um conjunto (também conhecido como bloco ou grupo de réplica) em uma tabela localizada no interior de uma estufa. Cada planta, controle ou experimental, é atribuída aleatoriamente a um local com um bloco que é mapeado para um local de estufa físico exclusivo, bem como para o grupo de réplica. Diversos grupos de réplica de trinta plantas cada um podem ser cultivados na mesma estufa em um único experimento. A disposição dos grupos de réplica deverá ser determinada para minimizar exigências de espaço, bem como efeitos ambientais no interior da estufa. Essa disposição pode ser denominada disposição de estufa comprimida.

Uma alternativa para a adição de um grupo controle específico é a identificação das plantas transgênicas que não expressam o gene de interesse. Diversos métodos tais como RT-PCR podem ser aplicados para determinar quantitativamente o nível de expressão do gene introduzido. Plantas T0 que não expressam o transgene podem ser comparadas com as que o expressam.

Cada planta na população de eventos é identificada e rastreada ao longo de todo o processo de avaliação e os dados obtidos daquela planta são associados automaticamente com aquela planta, de tal forma que os dados recolhidos possam ser associados ao transgene conduzido pela planta. Cada recipiente de planta pode possuir, por exemplo, um rótulo com leitura mecânica (tal como um código de barras do Código Universal de Produtos (UPC)) que

inclui informações sobre a identidade da planta que, por sua vez, são correlacionadas a um local na estufa, de tal forma que os dados obtidos da planta possam ser associados automaticamente àquela planta.

Alternativamente, pode ser utilizado qualquer sistema de identificação de plantas com leitura mecânica, tal como código de matriz bidimensional ou mesmo marcas de identificação por rádio frequência (RFID), em que os dados são recebidos e interpretados por um processador/receptor de rádio frequência. Vide o Pedido de Patente Publicado Norte-Americano nº 2004/0122592, incorporado ao presente como referência.

#### **ANÁLISE FENOTÍPICA UTILIZANDO FORMAÇÃO DE IMAGENS TRIDIMENSIONAIS:**

Cada planta de estufa na população de eventos T0, incluindo quaisquer plantas controle, é analisada para determinar características agronômicas de interesse e os dados agronômicos de cada planta são registrados ou armazenados de uma forma que seja associada aos dados de identificação (vide acima) para aquela planta. A confirmação de um fenótipo (efeito genético) pode ser realizada na geração T1 com um projeto experimental similar ao descrito acima.

As plantas T0 são analisadas no nível fenotípico utilizando tecnologia de formação de imagens quantitativas não destrutivas ao longo de todo o ciclo de vida da planta na estufa para determinar as características de interesse. Preferencialmente, um analisador de imagens digital é utilizado para análise multidimensional automática das plantas totais. A formação de imagens pode ser realizada no interior da estufa. Dois sistemas de câmeras, localizados no topo e ao lado, e um aparelho para girar a planta, são utilizados para observar e elaborar imagens das plantas de todos os lados. As imagens são obtidas a partir do topo, frente e lado de cada planta. Todas as três imagens juntas fornecem informações suficientes para avaliar a biomassa, tamanho e morfologia de cada planta.

Devido à alteração de tamanho das plantas a partir do momento em que a primeira folha surge do solo até o momento em que as plantas encontram-se no final do seu desenvolvimento, os estágios iniciais do desenvolvimento da planta são mais bem documentados com uma ampliação  
5 mais alta a partir do topo. Isso pode ser obtido utilizando um sistema de lentes de zoom motorizado que é totalmente controlado pelo software de formação de imagens.

Em uma única operação de análise de imagens, ocorrem os eventos a seguir: (1) a planta é conduzida no interior da área do analisador,  
10 girada a 360 graus de forma que o seu rótulo com leitura mecânica possa ser lido e mantido em repouso até que as suas folhas parem de mover-se; (2) a imagem lateral é tomada e introduzida em um banco de dados; (3) a planta é girada a noventa graus e novamente mantida em repouso até que as suas folhas parem de mover-se; e (4) a planta é transportada para fora do  
15 analisador.

Oferece-se às plantas pelo menos seis horas de escuro por período de 24 horas, para obter um ciclo normal de dia e noite.

#### **INSTRUMENTAÇÃO DE FORMAÇÃO DE IMAGENS:**

Pode-se utilizar qualquer instrumentação de formação de imagens  
20 apropriada, incluindo, mas sem limitar-se a instrumentação de formação de imagens digital de espectro de luz disponível comercialmente por meio da LemnaTec GmbH de Wurselen, Alemanha. As imagens são tomadas e analisadas com um Analisador de Varrimento LemnaTec HTS LT-0001-2 que possui um dispositivo de formação de imagens 1/2" IT Progressive Scan IEE  
25 CCD. As câmeras de formação de imagens podem ser equipadas com um zoom de motor, abertura de motor e foco de motor. Todas as configurações da câmera podem ser realizadas utilizando software LemnaTec. Preferencialmente, a variação instrumental do analisador de formação de

imagens é de menos de cerca de 5% para os componentes principais e menos de cerca de 10% para os componentes menores.

#### **SOFTWARE:**

O sistema de análise de formação de imagens compreende um  
5 programa de software LemnaTec HTS Bonit para análise de coloração e  
arquitetura e um banco de dados de servidor para armazenagem de dados de  
cerca de 500.000 análises, incluindo as datas das análises. As imagens  
originais e as imagens analisadas são armazenadas juntas para permitir que o  
usuário realize o máximo de reanálise desejado. O banco de dados pode ser  
10 conectado ao hardware de formação de imagens para coleta e armazenagem  
automática de dados. Uma série de sistemas de software disponíveis  
comercialmente (tais como Matlab e outros) pode ser utilizada para  
interpretação quantitativa dos dados de formação de imagens e qualquer  
desses sistemas de software pode ser aplicado ao conjunto de dados de  
15 imagem.

#### **SISTEMA CONDUTOR:**

Pode ser utilizado um sistema condutor com um dispositivo de  
rotação de planta para transportar as plantas para a área de formação de  
imagem e girá-las durante a formação de imagens. Até quatro plantas, cada  
20 uma com uma altura máxima de 1,5 m, são carregadas, por exemplo, sobre  
carros que trafegam ao longo do sistema condutor em circulação e da área de  
medição de formação de imagens. Neste caso, a pegada total da unidade  
(analisador de formação de imagens e circuito condutor) é de cerca de 5 m x 5  
m.

25 O sistema condutor pode ser ampliado para acomodar mais  
plantas de cada vez. As plantas são transportadas ao longo do circuito  
condutor até a área de formação de imagens e analisadas por até cinquenta  
segundos por planta. São tomadas três vistas da planta. O sistema condutor,

bem como o equipamento de formação de imagens, deverá ser capaz de ser utilizado em condições ambientais de estufa.

#### ILUMINAÇÃO:

Qualquer modo apropriado de iluminação pode ser utilizado para a obtenção de imagens. Pode-se utilizar, por exemplo, uma luz superior acima de um fundo preto. Alternativamente, pode-se utilizar uma combinação de luz superior e traseira utilizando um fundo branco. A área iluminada deverá ser abrigada para garantir condições de iluminação constante. O abrigo deverá ser mais longo que a área de medição, de forma que prevaleçam condições de luz constante sem a necessidade de abertura ou fechamento de portas. Alternativamente, a iluminação pode variar para causar excitação de qualquer transgene (tal como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha (RFP)) ou fluoróforos endógenos (tais como clorofila).

#### ESTIMATIVA DE BIOMASSA COM BASE NA FORMAÇÃO DE IMAGENS TRIDIMENSIONAIS:

Para melhor estimativa da biomassa, as imagens de plantas deverão ser tomadas de pelo menos três eixos, preferencialmente a vista superior e duas vistas laterais (lados 1 e 2). Estas imagens são analisadas em seguida para separar a planta do fundo, vaso e saco de controle de pólen (se aplicável). O volume da planta pode ser estimado por meio do cálculo:

$$Volume(voxels) = \sqrt{TopArea(pixels)} \times \sqrt{Side1Area(pixels)} \times \sqrt{Side2Area(pixels)}$$

Na equação acima, as unidades de volume e de área são “unidades arbitrárias”. Unidades arbitrárias são totalmente suficientes para detectar efeitos genéticos sobre o tamanho da planta e o crescimento neste sistema porque o que se deseja é detectar diferenças (tanto positivas-maiores quanto negativas-menores) da média experimental, ou média de controle. As unidades arbitrárias de tamanho (tais como área) podem ser convertidas de forma trivial em medições físicas por meio da adição de uma referência física

ao processo de formação de imagens. Uma referência física de área conhecida, por exemplo, pode ser incluída nos processos de formação de imagens superior e lateral. Com base na área dessas referências físicas, pode ser determinado um fator de conversão para permitir a conversão de pixels em  
5 uma unidade de área tal como centímetros quadrados (cm<sup>2</sup>). A referência física pode ou não ser uma amostra independente. O vaso, com um diâmetro e altura conhecidos, poderá servir, por exemplo, de referência física adequada.

#### CLASSIFICAÇÃO DAS CORES:

A tecnologia de formação de imagens pode também ser utilizada  
10 para determinar a coloração da planta e atribuir colorações de plantas a várias classes de cores. A atribuição de cores de imagens a classes de cores é uma característica inerente do software LemnaTec. Com outros sistemas de software de análise de imagens, a classificação das cores pode ser determinada por meio de uma série de abordagens computacionais.

15 Para determinação de parâmetros de crescimento e tamanho das plantas, um esquema de classificação útil é a definição de um esquema de coloração simples que inclui duas ou três tonalidades de verde e, além disso, uma classe de coloração para clorose, necrose e branqueamento, caso ocorram essas condições. Uma classe de coloração de fundo que inclui cores  
20 não de plantas na imagem (tais como cores de vaso e solo) também é utilizada e esses pixels são excluídos especificamente da determinação de tamanho. As plantas são analisadas sob iluminação controlada constante, de forma que qualquer alteração em uma planta ao longo do tempo ou entre plantas ou diferentes bateladas de plantas (tais como diferenças sazonais) possa ser  
25 quantificada.

Além da sua utilidade na determinação do crescimento do tamanho das plantas, a classificação de coloração pode ser utilizada para determinar outras características de componentes de rendimento. Para essas

outras características de componentes de rendimento, podem ser utilizados esquemas de classificação de coloração adicionais. A característica conhecida como “manutenção da coloração verde”, que foi associada a aumentos do rendimento, pode ser determinada por uma classificação de coloração que  
5 separa tons de verde de tons de amarelo e marrom (que indicam tecidos senis). Aplicando-se esta classificação de coloração a imagens tomadas em direção ao final do ciclo de vida das plantas T0 ou T1, podem ser identificadas plantas que possuem quantidades maiores de coloração verde em comparação com cores amarela e marrom (expressas, por exemplo, como Razão entre  
10 Verde e Amarelo). Plantas com uma diferença significativa nesta razão entre Verde e Amarelo podem ser identificadas como conduzindo transgenes que apresentam impactos sobre esta característica agrônômica importante.

O botânico especializado reconhecerá que surgem outras cores de plantas que podem indicar saúde da planta ou reação à tensão (tais como  
15 antocianinas) e que outros esquemas de classificação de coloração podem fornecer medidas adicionais de ação genética em características relativas a essas respostas.

#### **ANÁLISE DA ARQUITETURA DAS PLANTAS:**

Transgenes que modificam parâmetros de arquitetura das plantas  
20 podem também ser identificados utilizando a presente invenção, incluindo parâmetros tais como altura e largura máxima, distâncias internodais, ângulo entre as folhas e a haste, número de folhas a partir dos nós e comprimento das folhas. O software de sistema LemnaTec pode ser utilizado para determinar a arquitetura das plantas conforme segue. A planta é reduzida à sua arquitetura  
25 geométrica principal em uma primeira etapa de formação de imagens e, em seguida, com base nessa imagem, pode-se realizar identificação parametrizada dos diferentes parâmetros de arquitetura. Transgenes que modificam qualquer desses parâmetros de arquitetura isoladamente ou em combinação podem ser

identificados por meio da aplicação das abordagens estatísticas descritas anteriormente.

#### **DATA DE DESPRENDIMENTO DO PÓLEN:**

A data de desprendimento do pólen é um parâmetro importante a ser analisado em uma planta transformada e pode ser determinada pela primeira aparição na planta de uma flor macho ativa. Para encontrar o objeto de flor macho, a extremidade superior da haste é classificada por coloração para detectar anteras amarelas ou violeta. Esta análise de classificação de coloração é utilizada em seguida para definir uma flor ativa que, por sua vez, pode ser utilizada para calcular a data de desprendimento do pólen.

Alternativamente, a data de desprendimento do pólen e outros atributos de plantas facilmente detectados visualmente (tais como data de polinização, primeira data de seda) podem ser registrados pelo pessoal responsável por realizar assistência à planta. Para maximizar a integridade dos dados e a eficiência do processo, estes dados são rastreados utilizando os mesmos códigos de barra empregados pelo dispositivo de análise digital de espectro de luz LemnaTec. Um computador com um leitor de código de barras, dispositivo de palma ou PC notebook pode ser utilizado para facilidade de captura de dados registrando o momento da observação, identificador da planta e o operador que registrou os dados.

#### **ORIENTAÇÃO DAS PLANTAS:**

Plantas de milho maduras cultivadas em densidades próximas do plantio comercial frequentemente possuem uma arquitetura plana. Isso significa que a planta possui um lado amplo claramente discernível e um lado estreito. É determinada a imagem da planta a partir do lado largo. A cada planta, é atribuída uma orientação básica bem definida para obter a diferença máxima entre as imagens do lado largo e das extremidades. A imagem superior é

utilizada para determinar o eixo principal da planta e um dispositivo giratório adicional é utilizado para girar a planta até a orientação apropriada antes de iniciar a obtenção de imagens principais.

### **EXEMPLO 19**

#### **5 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE MILHO DERIVADAS DE MILHO DURO GASPE BAY SOB**

##### **CONDIÇÕES DE LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO:**

Plantas transgênicas conterão duas ou três doses de milho duro Gaspe 3 com uma dose de GS3 (GS3/(Gaspe-3)2X ou GS3/(Gaspe-3)3X) e segregarão 1:1 para um transgene dominante. As plantas serão  
10 plantadas em Turface, um meio de vaso comercial, e regadas quatro vezes por dia com meio de crescimento de 1 mM KNO<sub>3</sub> e meio de crescimento de 2 mM KNO<sub>3</sub> ou mais (vide Fig. 16). Plantas controle cultivadas em meio de 1 mM KNO<sub>3</sub> serão menos verdes, produzirão menos biomassa e possuirão uma espiga menor na antese (vide Fig. 17 para uma ilustração de dados de  
15 amostra).

São utilizadas estatísticas para decidir se as diferenças observadas entre os tratamentos são realmente diferentes. A Fig. 17 ilustra um método que coloca letras depois dos valores. Esses valores na mesma coluna que possuem a mesma letra (não um grupo de letras) em seguida não são  
20 significativamente diferentes. Utilizando este método, caso não haja letras após os valores em uma coluna, não há diferenças significativas entre nenhum dos valores naquela coluna ou, em outras palavras, todos os valores naquela coluna são iguais.

A expressão de um transgene resultará em plantas com  
25 crescimento vegetal aprimorado em 1 mM KNO<sub>3</sub> em comparação com um nulo transgênico. Desta forma, a biomassa e o viço serão monitorados durante o crescimento e comparados com um nulo transgênico. Aprimoramentos do crescimento, viço e tamanho das espigas na antese serão indicações de maior

tolerância a nitrogênio.

### **EXEMPLO 20**

#### **ANÁLISE DE RENDIMENTO DE LINHAGENS DE MILHO COM GENES *RUM1* OU SIMILARES**

##### **A *RUM1*:**

5 Uma construção de DNA recombinante que contém um gene *RUM1* ou similar a *RUM1* pode ser introduzida em uma linhagem de milho, seja por meio de transformação direta ou introgressão de uma linhagem transformada separadamente.

10 Plantas transgênicas, sejam elas congênicas ou híbridas, podem passar por experimentos de campo mais vigorosos para estudar a melhoria do rendimento e/ou estabilidade sob várias condições ambientais, tais como variações na disponibilidade de água e nutrientes.

Análise de rendimento subsequente pode ser realizada para determinar se as plantas que contêm gene *RUM1* ou similar a *RUM1* possuem  
15 uma melhoria do desempenho de rendimento sob diversas condições ambientais, em comparação com as plantas controle que não contêm o gene *RUM1* ou similar a *RUM1*. A redução do rendimento pode ser medida para ambos. Plantas que contêm o gene *RUM1* ou similar a *RUM1* apresentam menos perda de rendimento com relação às plantas controle,  
20 preferencialmente perda de rendimento de 50%.

### **EXEMPLO 21**

#### **TESTES PARA DETERMINAR ALTERAÇÕES DA ARQUITETURA DE RAIZ EM MILHO:**

Plantas de milho transgênicas são testadas para determinar alterações da arquitetura de raiz na etapa de mudas, tempo de florescência  
25 ou amadurecimento. Testes de medição das alterações da arquitetura de raiz de plantas de milho incluem, mas sem limitar-se aos métodos descritos abaixo. Para facilitar testes manuais ou automáticos de alterações da arquitetura de raiz, as plantas de milho podem ser cultivadas em vasos

transparentes.

1. Massa de raízes (pesos secos). As plantas são cultivadas em Turface, um meio de crescimento que permite a fácil separação de raízes. Tecidos de raiz e broto secos no forno são pesados e é calculada uma razão  
5 entre raiz e broto.

2. Níveis de ramificação de raízes laterais. A extensão da ramificação de raízes laterais (tais como número de raízes laterais e comprimento de raízes laterais) é determinada por meio de subamostragem de um sistema de raiz completo, formação de imagens com um scanner de leito  
10 plano ou uma câmera digital e análise com software WinRHIZO® (Regent Instruments, Inc.).

3. Medições de largura de faixa de raízes. A faixa de raiz é a faixa ou massa de raízes que se forma no fundo de vasos de estufa à medida que as plantas amadurecem. A espessura da faixa de raiz é  
15 medida em mm no amadurecimento como uma estimativa aproximada da massa de raiz.

4. Contagem de raízes nodais. O número de raízes de coroa que surge dos nós superiores pode ser determinado após a separação da raiz do meio de sustentação (tal como mistura para vasos). Além disso, podem ser  
20 medidos o ângulo de raízes de coroa e/ou raízes de braço. Análise digital das raízes nodais e da quantidade de ramificação de raízes nodais forma uma outra extensão do método manual mencionado acima.

Todos os dados tomados sobre fenótipos de raízes são submetidos a análise estatística, normalmente um teste t para comparar as  
25 raízes transgênicas com a de plantas irmãs não transgênicas. ANOVA de uma via pode também ser utilizado em casos em que diversos eventos e/ou construções são envolvidos na análise.

#### **EXEMPLO 22**

### **LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE RUM1 E RUL:**

Demonstrou-se que as proteínas Aux/IAA de *Arabidopsis* e arroz estão localizadas no núcleo (Abel et al (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 326-330; Thakur et al (2005), *Biochim. Biophys. Acta* 1730: 196-205). Dois tipos de supostos sinais de localização nuclear (NLS) que são conservados na maior parte das proteínas Aux/IAA de arroz (Jain et al (2006), *Funct. Integr. Genomics* 6: 47-59) também estão presentes nas proteínas RUM1 e RUL de milho. Um NLS bipartite compreende resíduos KR, nos resíduos de aminoácidos 80 e 84 em RUM1 e RUL, respectivamente, e resíduos NYRKN, nos resíduos de aminoácidos 122 e 125 em RUM1 e RUL, respectivamente. Um NLS do tipo SV40 compreende os resíduos RKLKIMR nos resíduos de aminoácidos 244 e 247 em Rum1 e RUL, respectivamente.

A fim de confirmar que as proteínas RUM1 e RUL localizam-se no núcleo, pode-se analisar a expressão transitória das proteínas correspondentes em células epidérmicas de cebola. Em primeiro lugar, vetores que conduzem cDNAs de comprimento total dirigidas pelo promotor 35S de CaMV e fundidas por meio de tradução ao gene relator de YFP (Clontech) são construídos e introduzidos em seguida em células epidérmicas de cebola por meio de bombardeamento de partículas (Scott, A. et al (1999), *Biotechniques* 26 (6): 1125, 1128-32).

### **EXEMPLO 23**

#### **ANÁLISE DA ATIVIDADE REPRESSORA DE TRANSCRIÇÃO DE PROTEÍNAS RUM1 E RUL:**

As proteínas Aux/IAA exibem um motivo LxLxL conservado que se demonstrou agir como um domínio repressor de transcrição (Tiwari et al (2004), *Plant Cell* 16: 533-543). O motivo LxLxL também está presente nas proteínas RUM1 e RUL no resíduo 42 em RUM1 e 40 em RUL (Fig. 18).

A fim de determinar se RUM1 e RUL são repressores de

transcrição, pode-se analisar a sua atividade repressora por meio de teste de transfecção de protoplastas. Neste método, são utilizados um sistema de teste de transfecção de protoplastas de mesófilos de folhas de *Arabidopsis* e uma construção relatora que contém o gene relator de luciferase de vaga-lume (pGL3, Promega, Madison WI 53711) dirigido pelo promotor mínimo de CaMV 35S (nucleotídeos -46 a -1) com quatro sequências de união de DNA GAL4 (SEQ ID N° 64). O repórter de luciferase é cotransfectado com um gene efetor que codifica uma proteína quimérica que consiste do domínio de união de DNA GAL4 de levedura (aminoácidos 1 a 147 da pGBKT7, Clontech) fundido em quadro aos cDNAs de *RUM1* ou *RUL*. Os genes efetores são dirigidos por uma sequência amplificadora de CaMV 35S duplicada (nucleotídeos -206 a 46) seguida pelo promotor mínimo de CaMV 35S. Uma construção que contém apenas o promotor 35S e GAL4 DBD é utilizada como um controle efetor. Os plasmídeos efetores (5 µg) são cotransfectados com plasmídeos relatores (10 µg) em uma razão de 1:2. A eficiência de transfecção é normalizada por meio da adição de 100 ng de um gene relator de *pUbiquitina:Renilla LUC* (phRL-TK, Promega, Madison WI 53711) (Tiwari et al (2005), *Methods in Mol. Biol.* 323: 237-244). Caso *RUM1* e *RUL* funcionem como repressores de transcrição, espera-se que os efetores *RUM1* e *RUL* reduzam a atividade de luciferase relativa do relator em comparação com o controle efetor.

#### EXEMPLO 24

##### COMPOSIÇÃO DE BIBLIOTECAS DE CDNA – ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DE

25

##### CLONES DE CDNA:

Foram preparadas bibliotecas de cDNA que representam mRNAs de diversos tecidos de *Brassica napus* (canola), *Glycine max* (soja) e *Triticum aestivum* (trigo). As características das bibliotecas são descritas

abaixo.

**TABELA 2**

**BIBLIOTECAS DE cDNA DE CANOLA, SOJA E TRIGO**

<b>Biblioteca</b>	<b>Tecido</b>	<b>Clone</b>
ebb1c	Botões imaturos de linhagem mutante knockout de gene Rf de canola, 02SM2. Isolamento de genes envolvidos na restauração de CMS.	ebb1c.pk008.p9: fis
smj1c	Caracterização de transcritos de IPT de soja transgênica. A construção de aprimoramento de rendimento líder (YE2.1 de soja) está expressando gene isopentenil transferase de <i>Agrobacterium</i> e necessitamos caracterizar todos os transcritos do transgene.	smj1c.pk013.h7.f: fis smj1c.pk007.k12.f: fis
wdk1c	Semente de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> L.) em desenvolvimento, três dias após a antese.	wdk1c.pk023.b8: fis

Bibliotecas de cDNA podem ser preparadas por meio de qualquer  
 5 um dentre muitos métodos disponíveis. Os cDNAs podem ser introduzidos em  
 vetores de plasmídeos, por exemplo, por meio de preparação, em primeiro  
 lugar, das bibliotecas de cDNA em vetores Uni-ZAP® XR de acordo com o  
 protocolo do fabricante (Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA). As  
 bibliotecas Uni-ZAP® XR são convertidas em bibliotecas de plasmídeos de  
 10 acordo com o protocolo fornecido pela Stratagene. Mediante conversão,  
 insertos de cDNA estarão contidos no vetor de plasmídeo pBluescript. Além  
 disso, os cDNAs podem ser introduzidos diretamente em vetores Bluescript II  
 SK(+) previamente cortados (Stratagene) utilizando T4 DNA ligase (New  
 England Biolabs), seguido por transfecção em células DH10B de acordo com o  
 15 protocolo do fabricante (GIBCO BRL Products). Depois que os insertos de  
 cDNA estiverem em vetores de plasmídeos, são preparados DNAs de

plasmídeo a partir de colônias bacterianas tomadas aleatoriamente que contêm plasmídeos pBluescript recombinantes ou as sequências de cDNA de insertos são amplificadas por meio de reação em cadeia de polimerase utilizando primers específicos para sequências de vetores que ladeiam as sequências de cDNA inseridas. DNAs de inserto amplificados ou DNAs de plasmídeo são sequenciados em reações de sequenciamento de primers de tingimento para gerar sequências de cDNA parciais (marcas de sequência expressas ou “ESTs”; vide Adams et al (1991), *Science* 252: 1651-1656). Os ESTs resultantes são analisados utilizando um sequenciador fluorescente Perkin Elmer Modelo 377.

São gerados dados de sequência de inserto completo (FIS) utilizando um protocolo de transposição modificado. Clones identificados para FIS são recuperados de estoques de glicerol arquivados na forma de colônias isoladas e DNAs de plasmídeos são isolados por meio de lise alcalina. Modelos de DNA isolados reagem com oligonucleotídeos frontais e reversos M13 com primer de vetor em uma reação de sequenciamento com base em PCR e carregados sobre sequenciadores automatizados. A confirmação da identificação de clones é realizada por meio de alinhamento de sequências com a sequência EST original da qual é realizada a solicitação de FIS.

Modelos confirmados são transpostos com o kit de transposição Primer Island (PE Applied Biosystems, Foster City CA), que é baseado no elemento que pode ser transposto Ty1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Devine e Boeke (1994), *Nucleic Acids Res.* 22: 3765-3772). O sistema de transposição *in vitro* coloca locais de união exclusivos aleatoriamente ao longo de toda uma população de moléculas de DNA grandes. O DNA transposto é utilizado em seguida para transformar células eletrocompetentes DH10B (Gibco BRL/Life Technologies, Rockville MD) por meio de eletroporação. O elemento que pode ser transposto contém um marcador selecionável adicional (denominado

DHFR; Fling e Ricards (1983), *Nucleic Acids Res.* 11: 5147-5158), que permite seleção dupla sobre placas Agar pelo menos desses subclones que contêm o transposson integrado. Diversos subclones são selecionados aleatoriamente a partir de cada reação de transposição, DNAs de plasmídeo são preparados por meio de uma lise alcalina e os modelos são sequenciados (mistura ReadyReaction de término de tintura ABI Prism) para fora do local de evento de transposição, utilizando primers exclusivos específicos para os locais de união dentro do transposson.

Dados de sequência são recolhidos (ABI Prism Collections) e montados utilizando Phred e Phrap (Ewing et al (1998), *Genome Res.* 8: 175-185; Ewing e Green (1998), *Genome Res.* 8: 186-194). Phred é um programa de software de domínio público que lê novamente os dados de sequências de ABI, convoca novamente as bases, atribui valores de qualidade e escreve as chamadas de base e valores de qualidade em arquivos de saída editáveis. O programa de conjunto de sequências Phrap utiliza estes valores de qualidade para aumentar a precisão dos contíguos de sequência montados. Os conjuntos são observados pelo editor de sequências Consed (Gordon et al (1998), *Genome Res.* 8: 195-202).

Em alguns dos clones, o fragmento de cDNA corresponde a uma parte do terminal 3' do gene e não cobre todo o quadro de leitura aberta. A fim de obter as informações acima no fluxo, utiliza-se um dentre dois protocolos diferentes. O primeiro destes métodos resulta na produção de um fragmento de DNA que contém uma parte da sequência genética desejada, enquanto o segundo método resulta na produção de um fragmento que contém o quadro de leitura aberta completo. Estes dois métodos utilizam duas rodadas de amplificação por PCR para obter fragmentos de uma ou mais bibliotecas. As bibliotecas às vezes são selecionadas com base no conhecimento anterior que o gene específico

deverá ser encontrado em um certo tecido e, às vezes, são selecionados aleatoriamente. As reações para obter o mesmo gene podem ser realizadas em diversas bibliotecas em paralelo ou em um conjunto de bibliotecas. Os conjuntos de biblioteca normalmente são preparados utilizando de três a cinco bibliotecas diferentes e normalizados até diluição uniforme. Na primeira rodada de amplificação, os dois métodos utilizam um primer específico de vetor (frontal) correspondente a uma parte do vetor posicionado no terminal 5' do clone acoplado a um primer específico de gene (reverso). O primeiro método utiliza uma sequência que é complementar a uma parte da sequência genética já conhecida enquanto o segundo método utiliza um primer específico de gene complementar a uma parte da região não traduzida 3' (também denominada UTR). Na segunda rodada de amplificação, é utilizado um conjunto abrigado de primers para os dois métodos. O fragmento de DNA resultante é ligado a um vetor pBluescript utilizando um kit comercial e seguindo o protocolo do fabricante. Este kit é selecionado a partir de diversos fornecedores que incluem a Invitrogen® (Carlsbad CA), Promega Biotech (Madison WI) e Gibco-BRL (Gaithersburg MD). O DNA de plasmídeo é isolado por meio do método de lise alcalina e submetido a sequenciamento e montagem utilizando Phred/Phrap, conforme acima.

#### **EXEMPLO 25**

##### **IDENTIFICAÇÃO DE CLONES DE cDNA:**

Clones de cDNA que codificam polipeptídeos similares a RUM1 foram identificados por meio de condução de pesquisas de BLAST (Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico; Altschul et al (1993), *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; vide também a explicação do algoritmo BLAST no Web site para o Centro Nacional de Informações Biotecnológicas na Biblioteca Nacional de Medicina dos Institutos Nacionais de Saúde) de similaridade a sequências

contidas no banco de dados "nr" de BLAST (que compreende todas as traduções de CDS do GenBank não redundantes, sequências derivadas do Banco de Dados de Proteínas Brookhaven de estruturas tridimensionais, a última publicação importante do banco de dados de sequências de proteínas SWISS-PROT, bancos de dados EMBL e DDBJ). As sequências de cDNA obtidas conforme descrito no Exemplo 24 foram analisadas para determinar a similaridade para todas as sequências de DNA disponíveis ao público contidas no banco de dados "nr" utilizando o algoritmo BLASTN fornecido pelo Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI). As sequências de DNA foram traduzidas em todos os quadros de leitura e tiveram comparada a similaridade a todas as sequências de proteínas disponíveis ao público contidas no banco de dados "nr" utilizando o algoritmo BLASTX (Gish e States (1993), *Nat. Genet.* 3: 266-272) fornecido pelo NCBI. Para conveniência, o valor P (probabilidade) de observação de uma coincidência de uma sequência de cDNA para uma sequência contida nos bancos de dados pesquisados meramente ao acaso conforme calculado por meio de BLAST é relatado no presente como valor "pLog", que representa o negativo do logaritmo do valor P relatado. Conseqüentemente, quanto maior o valor pLog, maior a probabilidade de que a sequência de cDNA e o encontrado pelo BLAST representem proteínas homólogas.

ESTs submetidos a análise são comparados com o banco de dados GenBank conforme descrito acima. Os ESTs que contêm sequências mais primer 5 ou 3 podem ser encontrados utilizando o algoritmo BLASTn (Altschul et al (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402) contra o banco de dados particular da DuPont que compara sequências de nucleotídeos que compartilham regiões comuns ou sobrepostas de homologia de sequências. Quando existirem sequências comuns ou sobrepostas entre dois ou mais fragmentos de ácidos nucleicos, as sequências podem ser

montadas em uma única sequência de nucleotídeos contígua, de forma a estender o fragmento original na direção primer 5 ou 3. Após a identificação do EST mais 5-prime, a sua sequência completa pode ser determinada por meio de Sequenciamento de Insertos Completos conforme descrito no Exemplo 24. Genes homólogos pertencentes a espécies diferentes podem ser encontrados comparando-se a sequência de aminoácidos de um gene conhecido (de uma fonte particular ou um banco de dados público) contra um banco de dados de EST utilizando o algoritmo tBLASTn. O algoritmo tBLASTn pesquisa uma consulta de aminoácidos contra um banco de dados de nucleotídeos que é traduzido em todos os seis quadros de leitura. Esta pesquisa permite diferenças no uso de códons de nucleotídeos entre espécies diferentes e degeneração de códons.

#### **EXEMPLO 26**

##### **CARACTERIZAÇÃO DE CLONES DE cDNA QUE CODIFICAM POLIPEPTÍDEOS RUM1,**

##### **POLIPEPTÍDEOS RUL E SEUS HOMÓLOGOS:**

A pesquisa de BLASTX utilizando as sequências de EST de clones relacionados na Tabela 3 revelou similaridade entre os polipeptídeos codificados pelo ORF e proteínas de arroz, *Arabidopsis* e soja identificados como pertencentes à família AUX-IAA (Identificador Geral NCBI nº 34911088, 125553286, 15229343 e 2388689, correspondentes a SEQ ID Nº 65, 76, 74 e 75, respectivamente).

São exibidos na Tabela 3 e 4 os resultados de BLAST da literatura e patentes, respectivamente, para ESTs individuais ("EST"), as sequências dos insertos de cDNA completos que compreendem os clones de cDNA indicados ("FIS"), as sequências de contíguos montadas a partir de dois ou mais ESTs ("Contíguo"), sequências de contíguos montadas a partir de um FIS e um ou mais ESTs ("Contíguo\*") ou sequências que codificam uma proteína completa derivada de um FIS, um contíguo ou um

FIS e PCR ("CGS").

**TABELA 3**

**RESULTADOS DE BLAST (LITERATURA) E PERCENTUAL DE IDENTIDADE PARA SEQUÊNCIAS QUE CODIFICAM POLIPEPTÍDEOS RUM1 E RUL E SEUS HOMÓLOGOS**

Sequência	Situação	Avaliação pLOG BLAST para	Percentual de identidade
B73-Mu-wt RUM1 (SEQ ID Nº 24)	cgs	77 (NCBI GI nº 34911088, SEQ ID Nº 65)	67,3 NCBI GI nº 34911088 (SEQ ID Nº 65)
B73 RUM1 (SEQ ID Nº 29)	cgs	78 (NCBI GI nº 34911088, SEQ ID Nº 65)	67,3 NCBI GI nº 34911088 (SEQ ID Nº 65)
B73 RUL (SEQ ID Nº 39)	cgs	77 (NCBI GI nº 34911088, SEQ ID Nº 65)	68,6 NCBI GI nº 34911088 (SEQ ID Nº 65)
ebb1c.pk008.p9: fis (SEQ ID Nº 67)	cgs	100 (NCBI GI nº 15229343, SEQ ID Nº 74)	90,3 (NCBI GI nº 15229343, SEQ ID Nº 74)
smj1c.pk013.h7.f: fis (SEQ ID Nº 69)	cgs	>180 (NCBI GI nº 2388689, SEQ ID Nº 75)	95,6 (NCBI GI nº 2388689, SEQ ID Nº 75)
smj1c.pk007.k12.f: fis (SEQ ID Nº 71)	cgs	> 180 (NCBI GI nº 2388689, SEQ ID Nº 75)	100 (NCBI GI nº 2388689, SEQ ID Nº 75)
wdk1c.pk023.b8: fis (SEQ ID Nº 73)	cgs	79 (NCBI GI nº 125553286, SEQ ID Nº 76)	64,4 (NCBI GI nº 125553286, SEQ ID Nº 76)

5 A pesquisa BLASTX utilizando as sequências dos clones relacionados na Tabela 1 abaixo revelou similaridade entre os polipeptídeos codificados pela Tabela 3 que exhibe os resultados de BLAST para ESTs individuais ("EST"), as sequências dos insertos de cDNA completos que compreendem os clones de cDNA indicados ("FIS"), as  
10 sequências de contíguos montados a partir de dois ou mais ESTs

("Contíguo"), seqüências de contíguos montados a partir de um FIS e um ou mais ESTs ("Contíguo\*") ou seqüências que codificam uma proteína completa derivada de um FIS, contíguo, FIS e PCR ("CGS").

**TABELA 4****5 RESULTADOS DE BLAST (PATENTE) PARA SEQUÊNCIAS QUE CODIFICAM****POLIPEPTÍDEOS HOMÓLOGOS A POLIPEPTÍDEOS RUM1 E RUL E SEUS****HOMÓLOGOS**

<b>Seqüência</b>	<b>Situação</b>	<b>Referência</b>	<b>Avaliação de pLog de BLAST</b>	<b>Percentual de identidade</b>
B73-Mu-wt RUM1 (SEQ ID N° 24)	CGS	SEQ ID N° 349502 em US 2004/214272	106	98,8
B73 RUM1 (SEQ ID N° 29)	CGS	SEQ ID N° 349502 em US 2004/214272	106	99,3
B73 RUL (SEQ ID N° 39)	CGS	SEQ ID N° 6770 em US 2004/034888-A1	106	100
ebb1c.pk008.p9:fis (SEQ ID N° 67)	CGS	G456 em US 2007/022495	101	90,3
smj1c.pk013.h7.f.fis (SEQ ID N° 69)	CGS	SEQ ID N° 23940 em US 2006/107345	> 180	100
smj1c.pk007.k12.f.fis (SEQ ID N° 71)	CGS	SEQ ID N° 23940 em US 2006/107345	> 180	100

<b>Sequência</b>	<b>Situação</b>	<b>Referência</b>	<b>Avaliação de pLog de BLAST</b>	<b>Percentual de identidade</b>
wdk1c.pk023.b8:fis (SEQ ID N° 73)	CGS	SEQ ID N° 33260 em US 2006/107345	83	66,4

Alinhamentos de sequência e cálculos de percentuais de identidade foram realizados utilizando o programa Megalign da suíte de computação bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison WI). Alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o método de alinhamento Clustal (Higgins e Sharp (1989), *CABIOS*. 5: 151-153) com os parâmetros padrão (PENALIDADE DO INTERVALO = 10, PENALIDADE DE COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10). Os parâmetros padrão para alinhamentos em pares utilizando o método Clustal foram COMPRIMENTO DE PALAVRA = 1, PENALIDADE DO INTERVALO = 3, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 5 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 5.

### REIVINDICAÇÕES

1. PLANTA QUE COMPREENDE NO SEU GENOMA UMA CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos um elemento regulador, em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que contém uma sequência de aminoácidos com pelo menos 50% de identidade de sequências, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparado com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73, em que a mencionada planta exibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

2. PLANTA, de acordo com a reivindicação 1, em que a planta é uma planta de milho ou uma planta de soja.

3. PLANTA, que compreende no seu genoma:

- uma construção de DNA recombinante que compreende:

a. um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos um elemento regulador, em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou

b. uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

(i) no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um complemento total da sequência de ácido nucleico de (b) (i) (A); ou

(ii) uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem

sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácidos nucleicos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparado com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região e em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou polipeptídeo similar a RUM1, e em que a mencionada planta exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica quando comparado com uma planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

10           4.     PLANTA, de acordo com a reivindicação 3, em que a planta é uma planta de milho ou uma planta de soja.

15           5.     PLANTA, de acordo com a reivindicação 3, em que a mencionada planta exibe a mencionada alteração da mencionada pelo menos uma característica argonômica quando comparada, sob condições ambientais variáveis, para a mencionada planta controle que não compreende a mencionada construção de DNA recombinante.

          6.     PLANTA, de acordo com a reivindicação 5, em que as mencionadas condições ambientais variáveis são pelo menos uma selecionada a partir de seca, nitrogênio, insetos ou doenças.

20           7.     PLANTA, de acordo com a reivindicação 5, em que a planta é uma planta de milho ou uma planta de soja.

          8.     PLANTA, de acordo com a reivindicação 6, em que a planta é uma planta de milho ou uma planta de soja.

25           9.     PLANTA, de acordo com a reivindicação 7, em que a planta é uma planta de milho ou uma planta de soja.

          10.    PLANTA, de acordo com a reivindicação 3, em que a mencionada pelo menos uma característica agronômica é selecionada a partir do grupo que consiste de viço, rendimento, velocidade de crescimento,

biomassa, peso fresco no amadurecimento, peso seco no amadurecimento, rendimento de frutos, rendimento de sementes, teor total de nitrogênio da planta, teor de nitrogênio dos frutos, teor de nitrogênio de sementes, teor de nitrogênio em um tecido vegetativo, teor total de aminoácidos livres da planta, 5 teor de aminoácidos livres de frutos, teor de aminoácidos livres de sementes, teor de aminoácidos livres em um tecido vegetativo, teor total de proteína da planta, teor de proteína de frutos, teor de proteína de sementes, teor de proteína em um tecido vegetativo, tolerância à seca, absorção de nitrogênio, fixação de raízes, fixação de hastes, altura da planta, comprimento da espiga e 10 índice de colheita.

11. PLANTA, de acordo com a reivindicação 10, em que a planta é uma planta de milho ou uma planta de soja.

12. PLANTA, de acordo com a reivindicação 3, em que a mencionada planta exibe um aumento da mencionada pelo menos uma 15 característica agrônômica quando comparado com a mencionada planta controle.

13. PLANTA, de acordo com a reivindicação 12, em que a planta é uma planta de milho ou uma planta de soja.

14. MÉTODO DE ALTERAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ 20 EM PLANTAS, que compreende:

(a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante, que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de 25 aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; e

(b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula

vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e exibe arquitetura de raiz alterada quando comparado com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

5                    15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, que compreende adicionalmente:

(c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a mencionada planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e exibe arquitetura de raiz alterada quando comparada com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

16. MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ EM PLANTAS, que compreende:

(a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparado com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73;

(b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e

(c) avaliação da arquitetura de raiz da planta transgênica comparada a uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, que compreende adicionalmente:

(d) obtenção de uma planta de prole derivada a partir da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e

(e) avaliação da arquitetura de raiz da planta de prole comparada a uma planta controle, que não compreende a construção de DNA recombinante.

18. MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ EM PLANTAS, que compreende:

(a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73;

(b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante;

(c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e

(d) avaliação da arquitetura de raiz da planta de prole em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

19. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES DE UMA CARACTERÍSTICA AGRONÔMICA EM PLANTAS, que compreende:

(a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado

operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparado com SEQ ID N° 24, 29,  
5 39, 67, 69, 71 ou 73;

(b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e

(c) determinação se a planta transgênica exibe uma alteração  
10 de pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente:

(d) obtenção de uma planta de prole derivada a partir da planta  
15 transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e

(e) determinação se a planta de prole exibe alterações de pelo menos uma característica agronômica quando comparada com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

20 21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, em que a mencionada etapa de determinação compreende a determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação, sob condições ambientais variáveis, com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

25 22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 20, em que as mencionadas condições ambientais variáveis são pelo menos uma selecionada a partir de seca, nitrogênio, insetos ou doenças.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 20, em que a

mencionada etapa de determinação (e) compreende a determinação se a planta de prole exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica quando comparada, sob condições ambientais variáveis, com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

5                   24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, em que a mencionada condição ambiental variável é pelo menos uma selecionada a partir de seca, nitrogênio, inseto ou doença.

25. MÉTODO, de determinação de alterações de uma característica agronômica em plantas, que compreende:

10                   (a) introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA recombinante que compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no  
15 método de alinhamento Clustal V, quando comparado com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73;

(b) regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante;

20                   (c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante; e

(d) determinação se a planta de prole exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica quando comparada com uma planta  
25 controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

26. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 25, em que a mencionada etapa de determinação compreende a determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica

quando comparado, sob condições ambientais variáveis, com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

27. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES DE UMA CARACTERÍSTICA AGRONÔMICA EM PLANTAS, que compreende:

5 a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com  
10 pelo menos 50% de identidade de sequências, com base no método de alinhamento de Clustal V, em comparação com SEQ ID Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (b) (i) (A); ou

15 ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no  
20 todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;

b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

25 c. determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

28. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 27, em que a

mencionada etapa de determinação compreende a determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação, sob condições ambientais variáveis, com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

5                   29. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que a mencionada condição ambiental variável é pelo menos uma selecionada a partir de seca, nitrogênio, inseto ou doença.

30. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 27, que compreende adicionalmente:

10                   (d) obtenção de uma planta de prole derivada a partir da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

                    (e) determinação se a planta de prole exibe alterações de pelo menos uma característica agronômica quando comparada com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

15                   31. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 30, em que a mencionada etapa de determinação (e) compreende a determinação se a planta de prole exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação, sob condições ambientais variáveis, com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

20                   32. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 31, em que a mencionada condição ambiental variável é pelo menos uma selecionada a partir de seca, nitrogênio, inseto ou doença.

25                   33. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES DE UMA CARACTERÍSTICA AGRONÔMICA EM PLANTAS, que compreende:

                    a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, em comparação com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71  
5 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (a)  
(i) (A); ou

ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de  
10 sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparada com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;

b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão e exibe arquitetura de raiz alterada em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão;

c. obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

d. determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica em comparação com uma planta  
25 controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 33, em que a mencionada etapa de determinação compreende a determinação se a planta transgênica exibe uma alteração de pelo menos uma característica agronômica

em comparação, sob condições ambientais variáveis, com uma planta controle que não compreende a construção de DNA recombinante.

35. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 34, em que a mencionada condição ambiental variável é pelo menos uma selecionada a partir de seca, nitrogênio, inseto ou doença.

36. MÉTODO DE ALTERAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ EM UMA PLANTA, que compreende:

a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparada com SEQ ID Nº 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (a) (i) (A); ou

ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparada com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1; e

b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão e a planta transgênica exibe arquitetura e raiz alterada quando comparada com uma planta controle

que não compreende a construção de DNA de supressão.

37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 36, que compreende adicionalmente:

(c) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a mencionada planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante e em que a planta de prole exibe arquitetura de raiz alterada quando comparada com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

38. MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ EM UMA PLANTA, que compreende:

a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparada com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (a) (i) (A); ou

ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparada com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;

b. regeneração de uma planta transgênica a partir da célula

vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

c. avaliação da arquitetura de raiz da planta transgênica em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

39. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 38, que compreende adicionalmente:

(d) obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão; e

(e) avaliação da arquitetura de raiz da planta de prole em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

40. MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ EM UMA PLANTA, que compreende:

a. introdução em uma célula vegetal regenerável de uma construção de DNA de supressão que compreende pelo menos um elemento regulador ligado operativamente a:

i. no todo ou em parte: (A) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparado com SEQ ID N° 24, 29, 39, 67, 69, 71 ou 73; ou (B) um componente completo da sequência de ácido nucleico de (a) (i) (A); ou

ii. uma região derivada de uma fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, de um gene alvo de interesse, em que a mencionada região possui uma sequência de ácido nucleico com identidade de sequências de pelo menos 50%, com base no método de alinhamento Clustal

V, quando comparada com a mencionada fita com sentido ou fita sem sentido, no todo ou em parte, da qual é derivada a mencionada região, em que o mencionado gene alvo de interesse codifica RUM1 ou um polipeptídeo similar a RUM1;

5                   b.       regeneração de uma planta transgênica a partir da célula vegetal regenerável após a etapa (a), em que a planta transgênica compreende no seu genoma a construção de DNA de supressão;

                    c.       obtenção de uma planta de prole derivada da planta transgênica, em que a planta de prole compreende no seu genoma a  
10 construção de DNA de supressão; e

                    d.       avaliação da arquitetura de raiz da planta de prole em comparação com uma planta controle que não compreende a construção de DNA de supressão.

                    41.   POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, que compreende:

15                   i.       uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 85%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparada com SEQ ID N° 73; ou

                    ii.     um complemento total da sequência de ácido nucleico de  
20 (i).

                    42.   POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, que compreende:

                    i.       uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 90%, com base no método de alinhamento Clustal  
25 V, quando comparada com SEQ ID N° 73; ou

                    ii.     um complemento total da sequência de ácido nucleico de  
(i).

                    43.   POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, que compreende:

i. uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos com identidade de sequências de pelo menos 95%, com base no método de alinhamento Clustal V, quando comparada com SEQ ID N° 73; ou

5 ii. um complemento total da sequência de ácido nucleico de (i).

44. POLINUCLEOTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência de polipeptídeos compreende SEQ ID N° 73.

10 45. POLINUCLEOTÍDEO, de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência de ácido nucleico compreende SEQ ID N° 72.

46. FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, que compreende um promotor NAS2 de milho preferido de raiz.

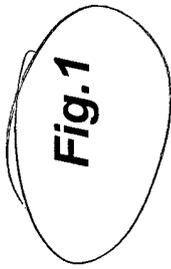
15 47. FRAGMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, que compreende um promotor de milho preferido de raiz em que o mencionado promotor consiste essencialmente da sequência de nucleotídeos descrita em SEQ ID N° 51.

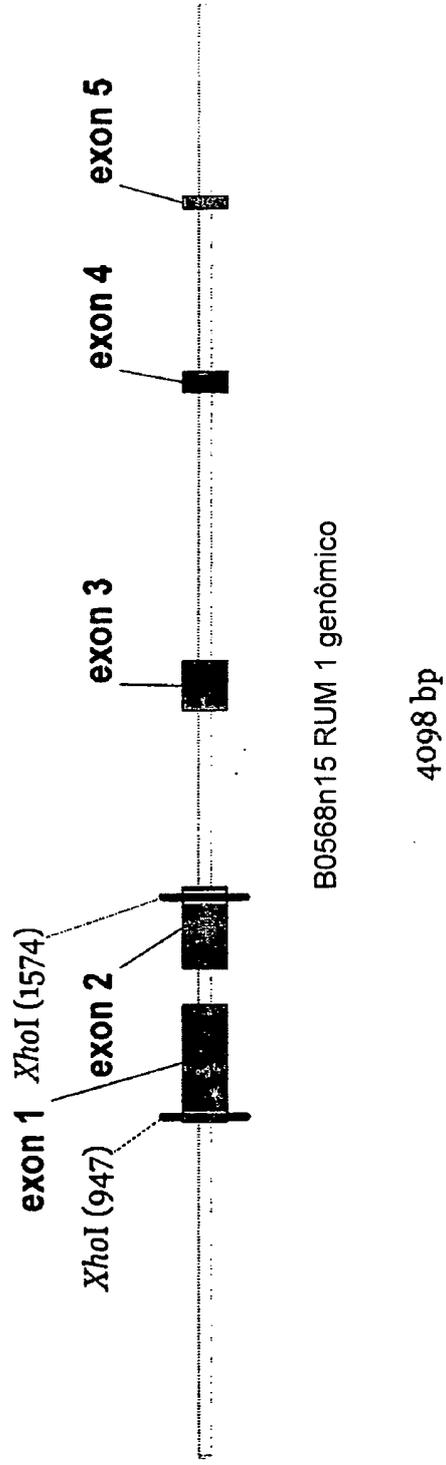
Mapeamento genético de RUM com SSRs

Total de SSRs analisados: 258

SSRs polimórficos F7/rum1

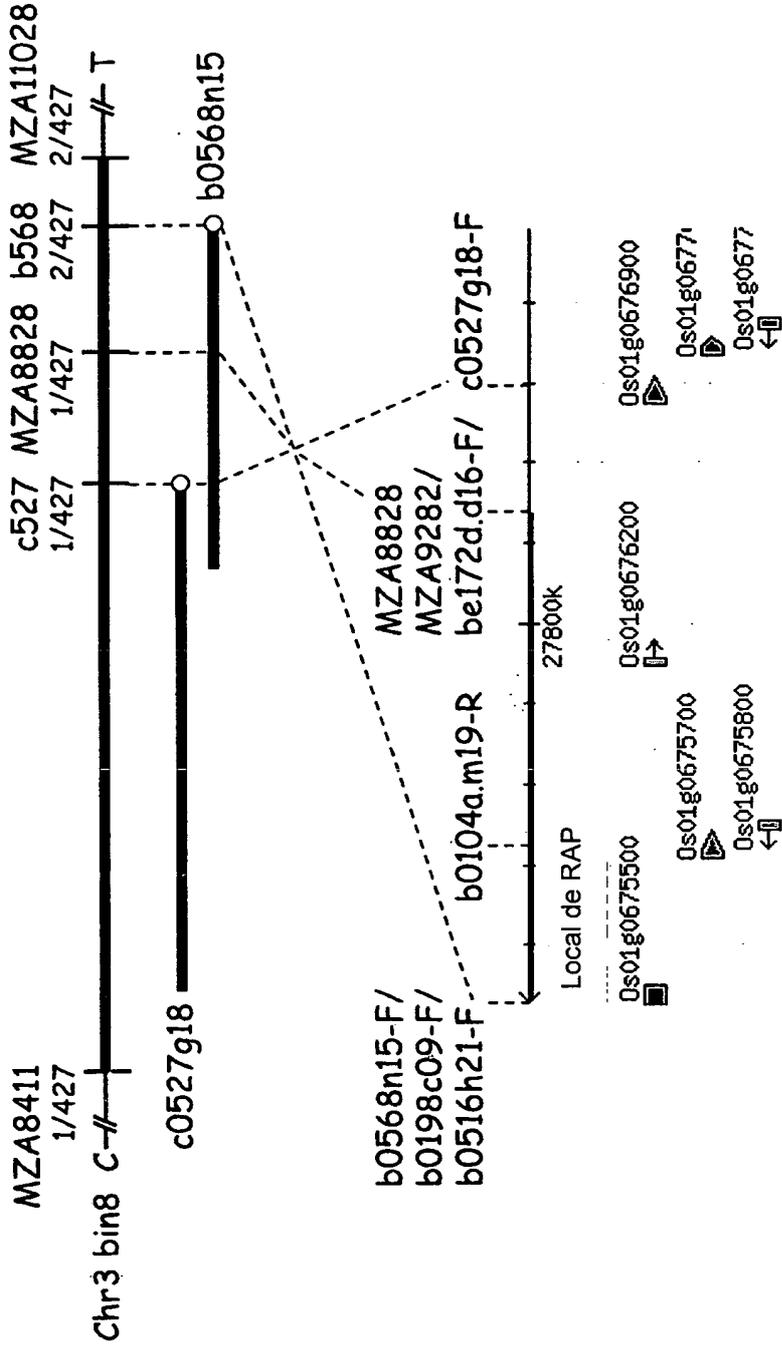
MARCADOR	Bin	IBM2	RESULTADOS
umc1071	1.01S	85.2	Sem ligação
umc1403	1.03S	210.6	Sem ligação
bnlg1203	1.03S	259.3	Sem ligação
umc1590	1.06C	517.0	Sem ligação
umc1278	1.07L	631.9	Sem ligação
umc1833	1.07L	647.8	Sem ligação
umc1446	1.08L	781.6	Sem ligação
umc1512	1.09L	812.3	Sem ligação
umc1306	1.09L	881.2	Sem ligação
bnlg1671	1.10L	913.4	Sem ligação
phi064	1.11L	1103.0	Sem ligação
umc1165	2.01S	47.4	Sem ligação
umc1823	2.02S	92.8	Sem ligação
umc1422	2.02S	156.6	Sem ligação
umc1448	2.04S	269.8	Sem ligação
umc1079	2.06L	369.3	Sem ligação
bnlg2077	2.07L	474.8	Sem ligação
umc2086	2.08L	544.4	Sem ligação
mmc0381	2.08L	572.4	Sem ligação
bnlg1647	3.02S	103.3	Sem ligação
umc1644	3.06L	473.1	ligação
umc1690	3.07L	544.6	ligação
umc1659	3.07L	544.6	ligação
umc1489	3.07L	567.6	ligação
umc1404	3.07L	568.3	ligação
umc1644	3.08L	596.9	ligação
umc2274	3.08L	608.6	ligação
phi046	3.08L	612.0	ligação
umc1915	3.08L	617.5	ligação
umc2152	3.09L	738.7	ligação
mmc0001	3.09L	759.9	ligação
umc2048	3.10L	824.7	ligação
umc1639	3.09L	824.7	Sem ligação
umc1594	3.09L	828.9	Sem ligação
umc1327	8.01S	55.0	Sem ligação
umc2004	8.02L	120.2	Sem ligação
umc1868	8.02L	200.3	Sem ligação
umc1735	8.03L	279.3	Sem ligação
umc1846	8.05L	357.9	Sem ligação
bnlg1031	8.06L	455.1	Sem ligação
umc1724	8.06L	457.3	Sem ligação
umc1056	8.08L	550.4	Sem ligação
umc1867	9.01S	24.3	Sem ligação
umc1258	9.02S	195.7	Sem ligação
umc1191	9.03C	232.8	Sem ligação
bnlg1714	9.04L	266.4	Sem ligação
umc1657	9.05L	344.8	Sem ligação
umc1804	9.07L	538.5	Sem ligação
umc1137	9.07L	603.5	Sem ligação
umc1380	10.00S	16.6	Sem ligação
umc1291	10.01S	58.8	Sem ligação
bnlg1451	10.02S	74.4	Sem ligação
umc1319	10.02S	82.2	Sem ligação
umc1432	10.02S	120.09	Sem ligação
umc1179	10.03C	206.5	Sem ligação
bnlg540	10.03C	225.7	Sem ligação
umc1077	10.04L	253.5	Sem ligação
umc1115	10.04L	285.9	Sem ligação
umc1272	10.04L	299.4	Sem ligação
umc1477	10.05L	366.3	Sem ligação
umc2122	10.06L	392.5	Sem ligação
bnlg1450	10.07L	483.7	Sem ligação
umc1759	4.01S	81	Sem ligação
umc2176	4.03S	174.6	Sem ligação
bnlg1265	4.05C	268.4	Sem ligação
umc2027	4.06L	349.8	Sem ligação
bnlg2291	4.06L	392.2	Sem ligação
umc1775	4.08L	443.2	Sem ligação
umc2188	4.08L	554.1	Sem ligação
umc1573	4.09L	644.3	Sem ligação
umc1260	5.00S	68.1	Sem ligação
bnlg565	5.02S	150.9	Sem ligação
umc1692	5.03S	271.5	Sem ligação
umc1349	5.04L	346.5	Sem ligação
umc1171	5.04L	376.4	Sem ligação
umc1155	5.05L	410.8	Sem ligação
umc1524	5.06L	493.5	Sem ligação
umc108	5.07L	536.6	Sem ligação
umc1225	5.08L	641.4	Sem ligação
umc1143	6.00S	17.3	Sem ligação
umc2068	6.00S	46.1	Sem ligação
umc1133	6.01S	96.6	Sem ligação
umc1887	6.03L	166.8	Sem ligação
bnlg1154	6.05L	253	Sem ligação
bnlg1702	6.05L	320.7	Sem ligação
phi299852	6.07L	450.7	Sem ligação
bnlg1136	6.07L	531.8	Sem ligação
umc1653	6.07L	534.6	Sem ligação
mmc0171	7.00S	64.3	Sem ligação
umc2160	7.01S	118.5	Sem ligação
bnlg2203	7.01S	190.6	Sem ligação
umc2142	7.02L	246.3	Sem ligação
umc1408	7.03L	365.4	Sem ligação
umc1029	7.04L	444.7	Sem ligação
umc1407	7.05L	600.2	Sem ligação





**Fig.2**

Mapa físico de RUM1 e sistema com arroz



CH1 de arroz: 27752889 ~ 27830748 bp

Fig.3

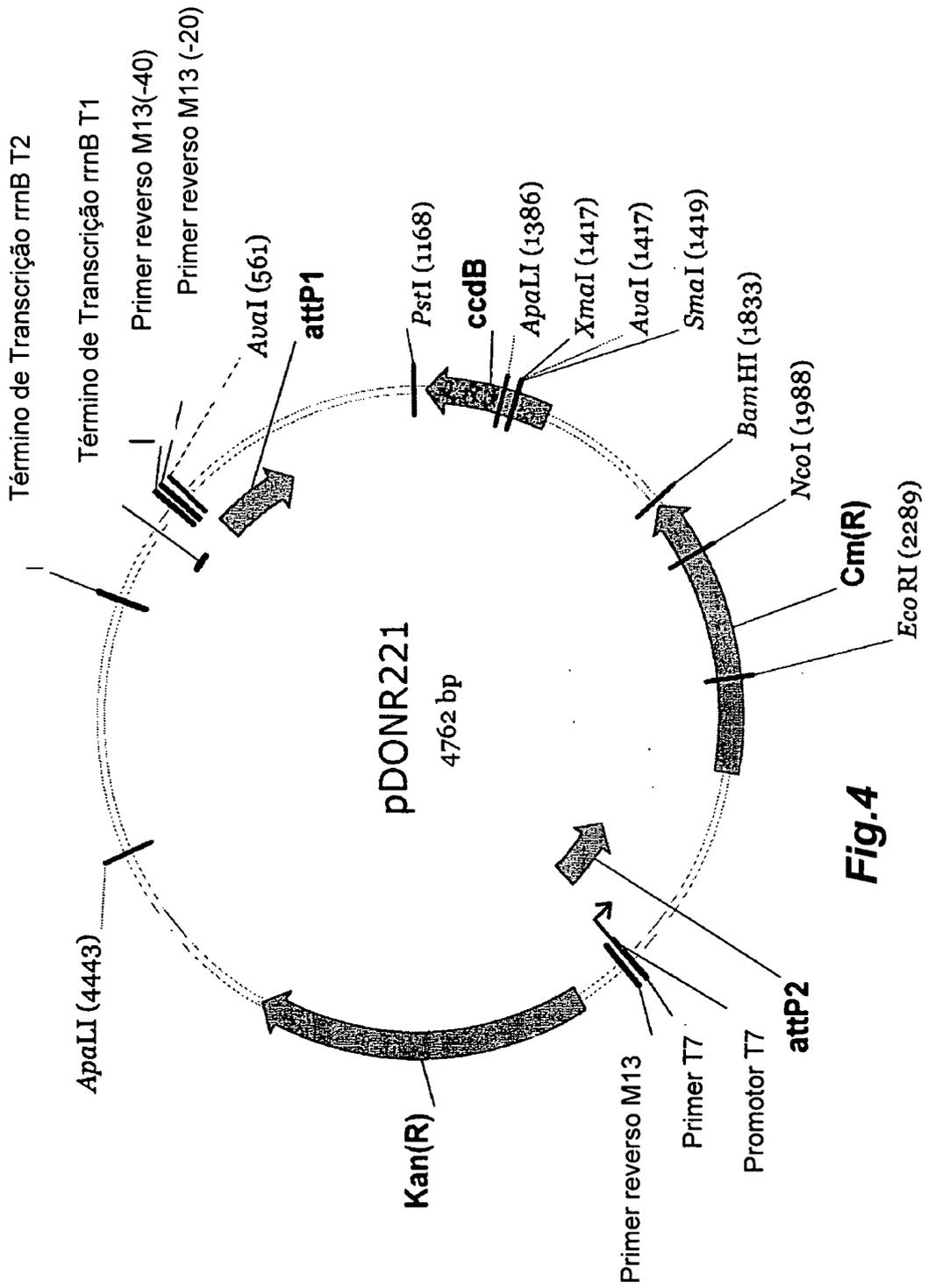


Fig.4

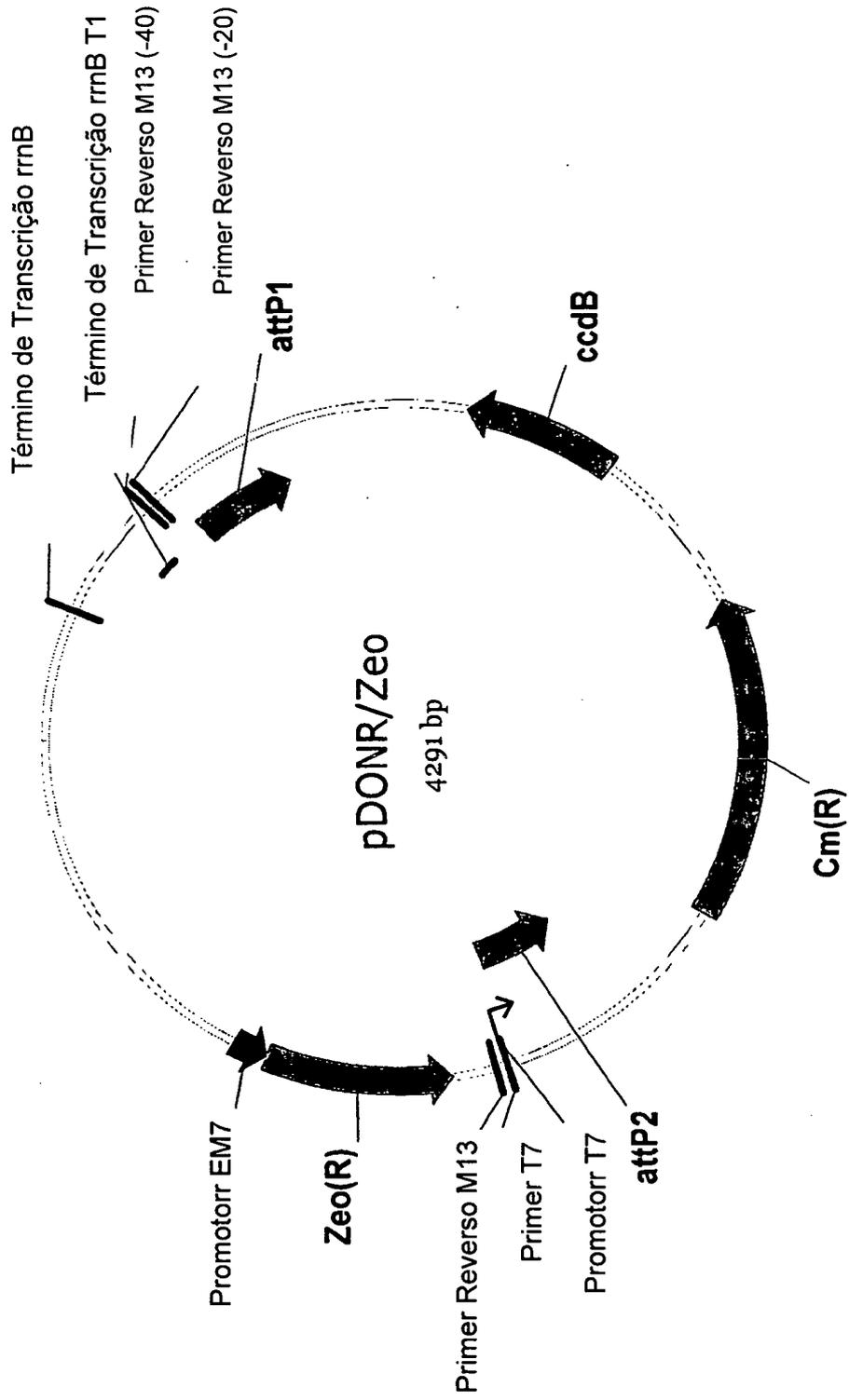


Fig.5

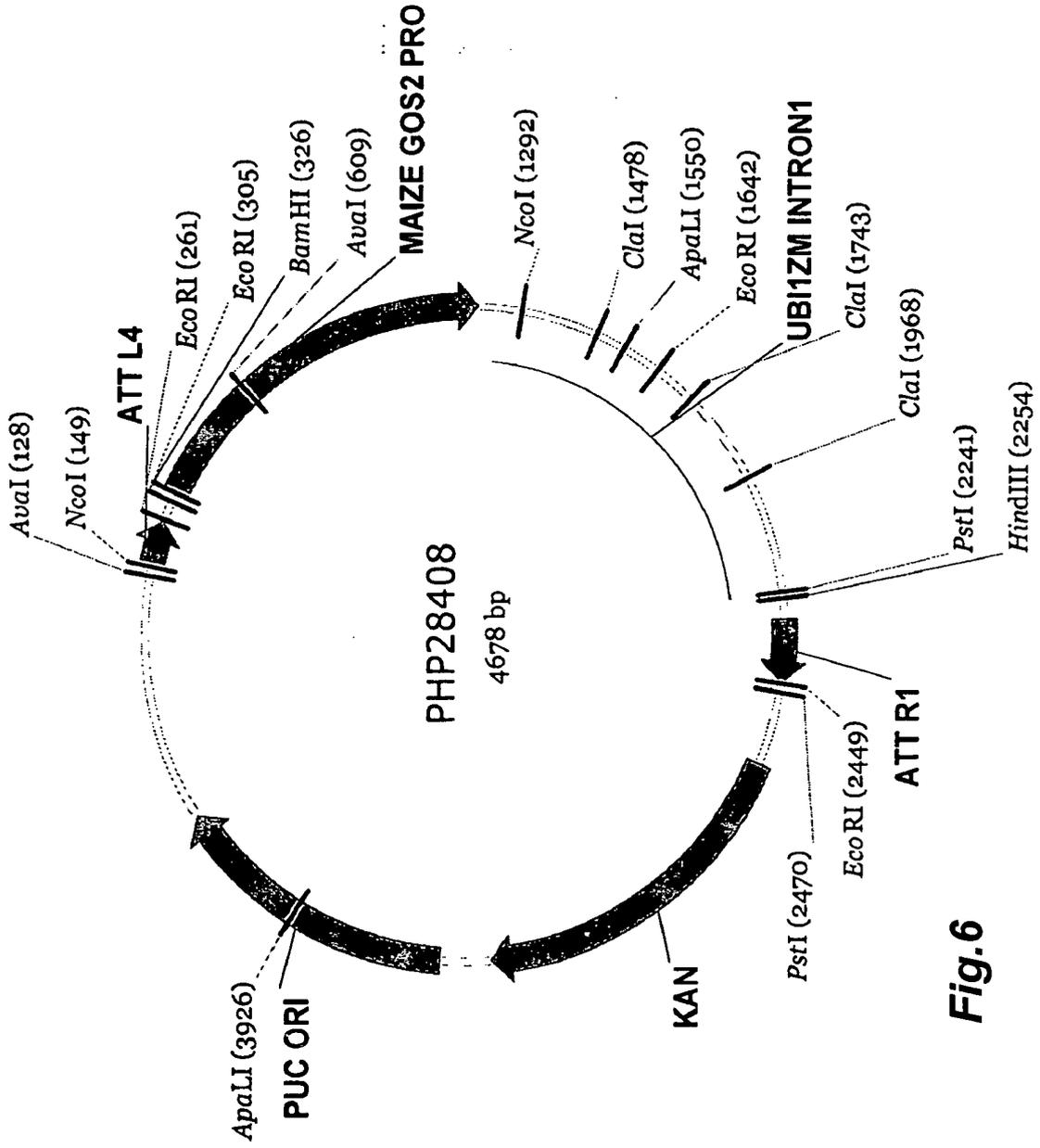


Fig.6

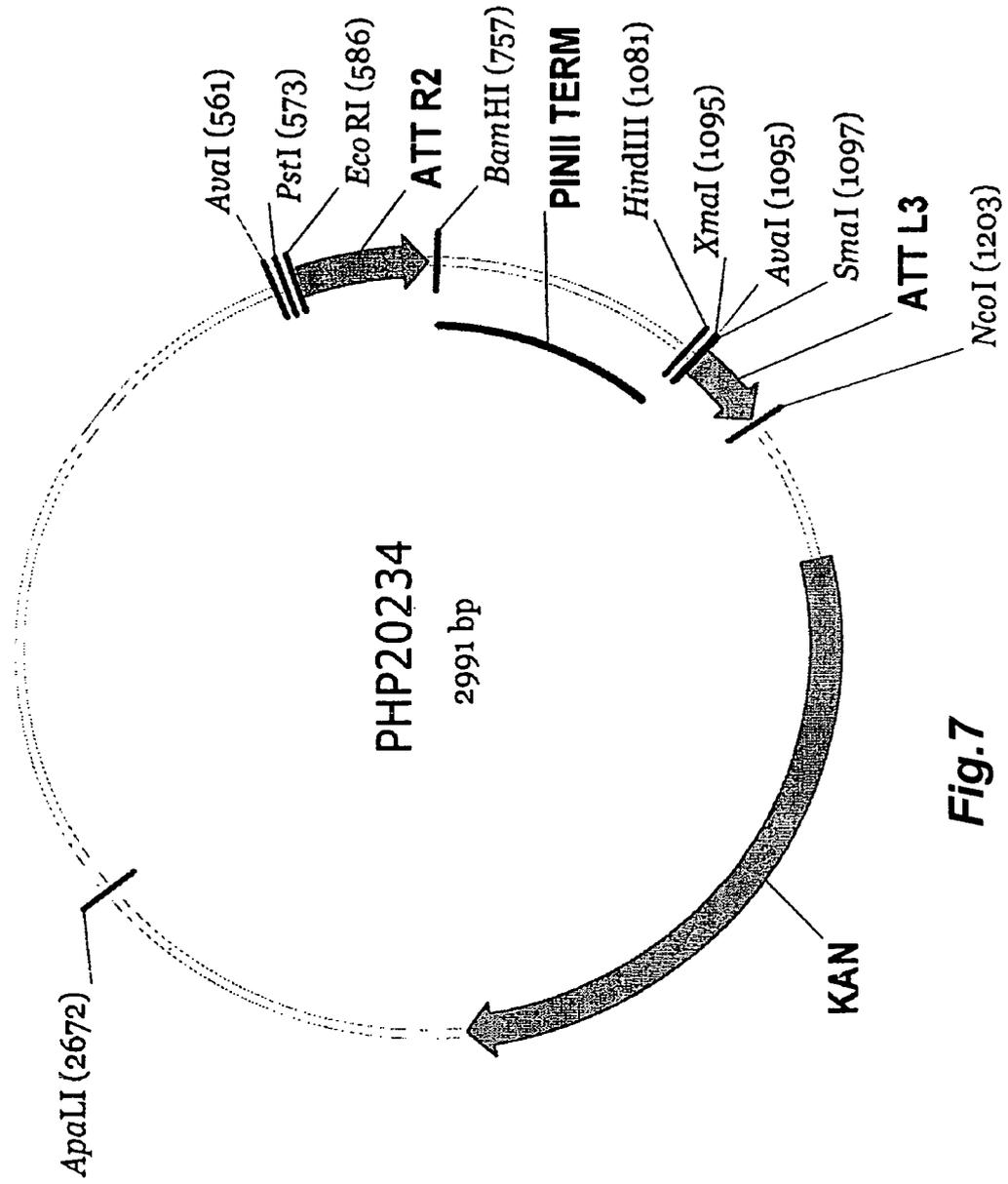
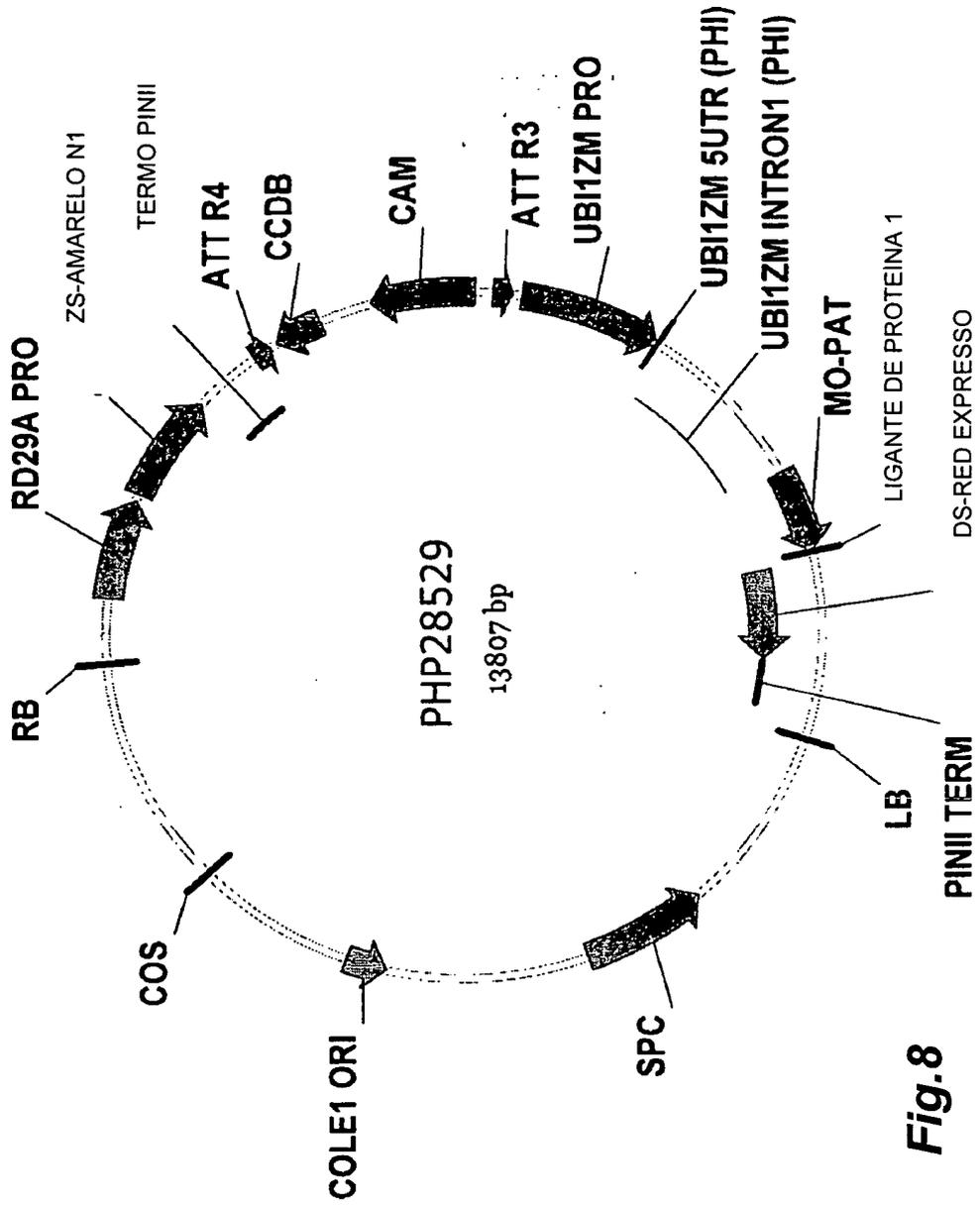


Fig.7



**Fig.8**

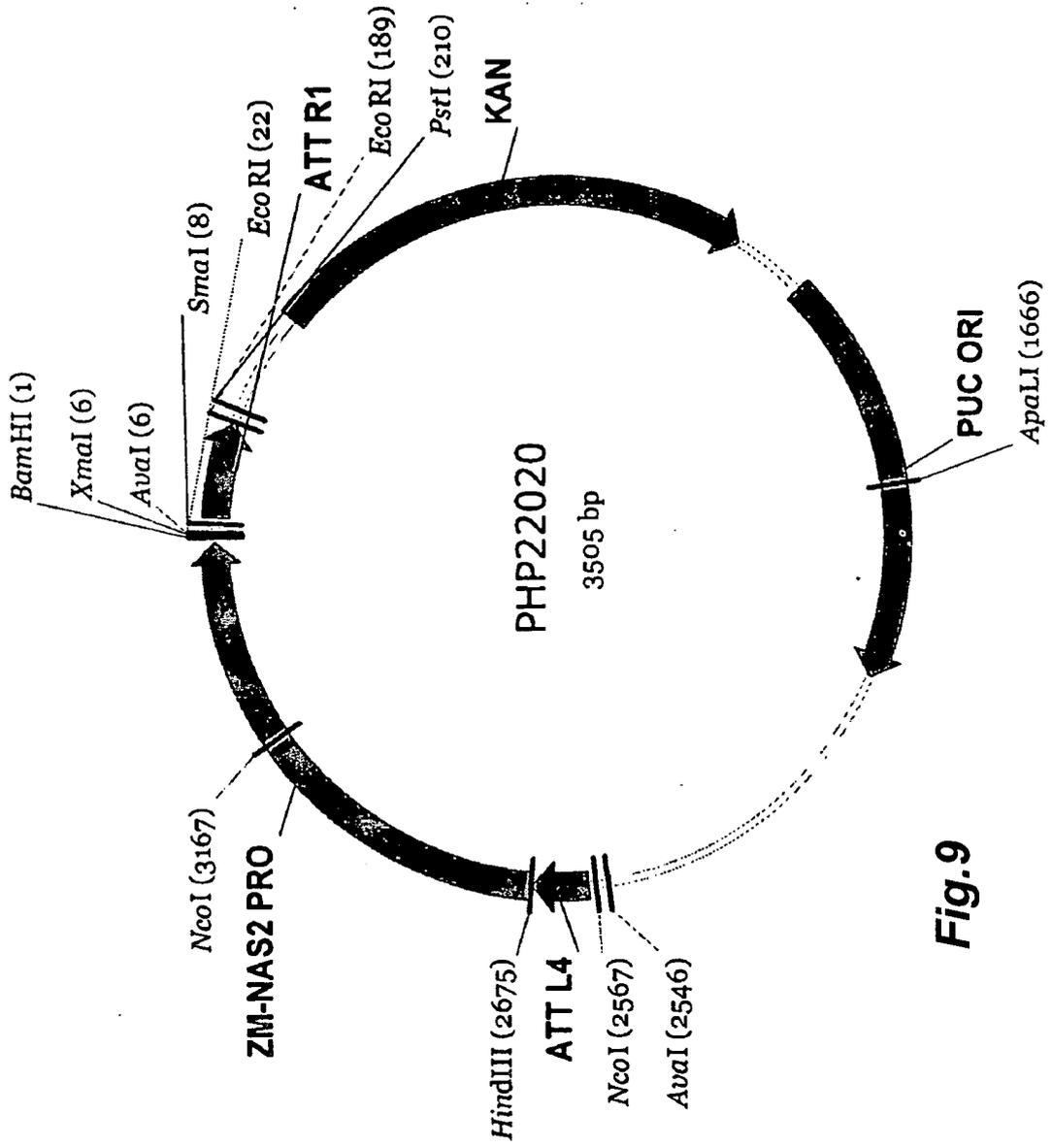


Fig.9

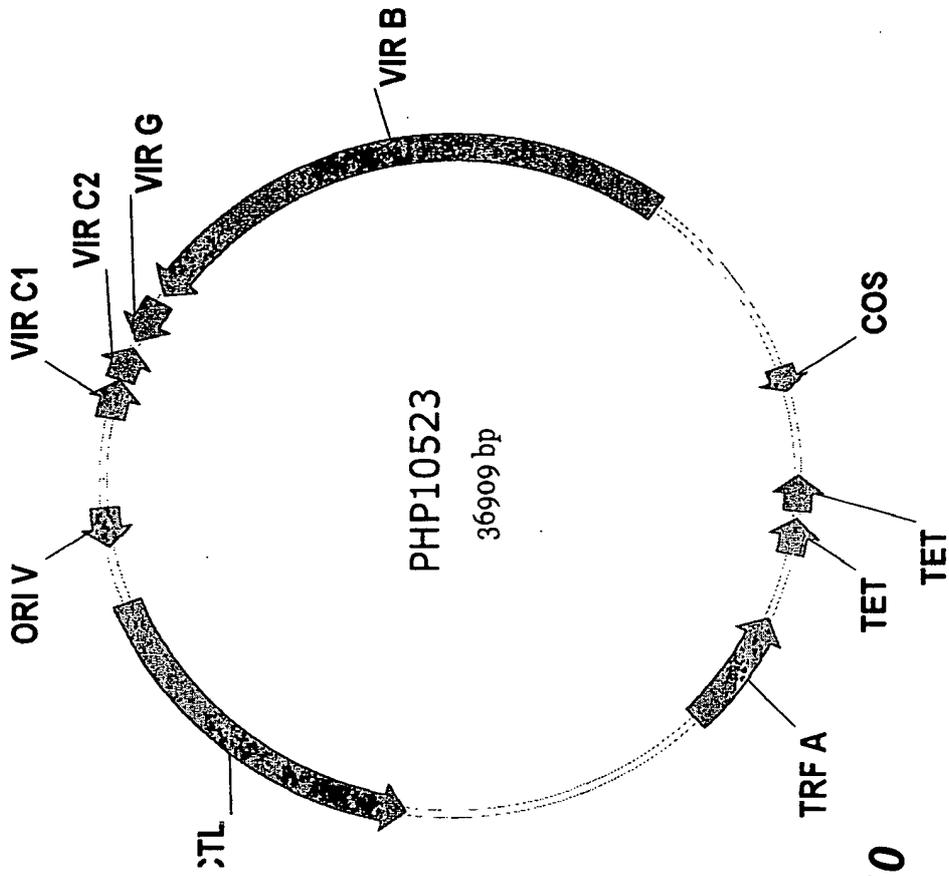


Fig.10

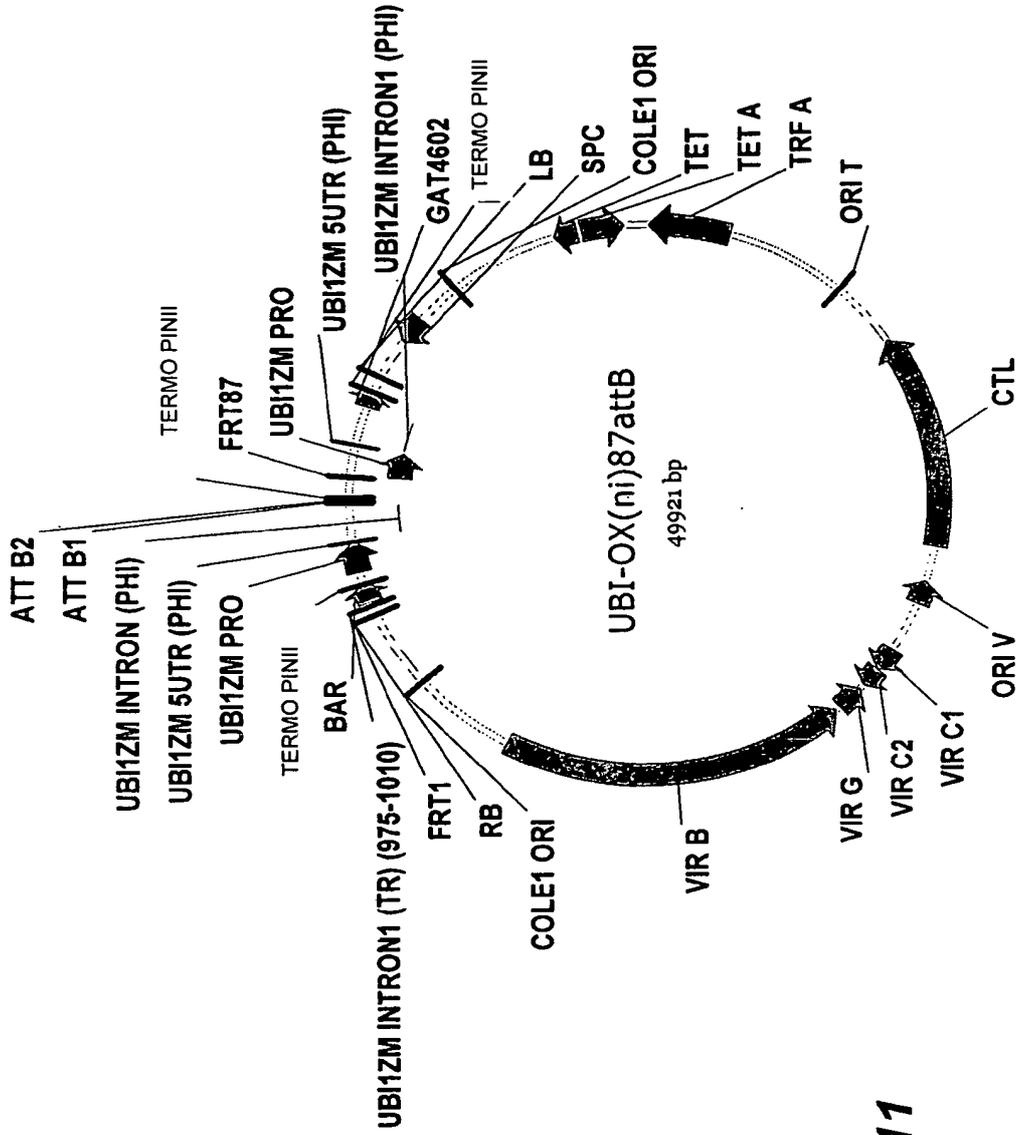


Fig.11

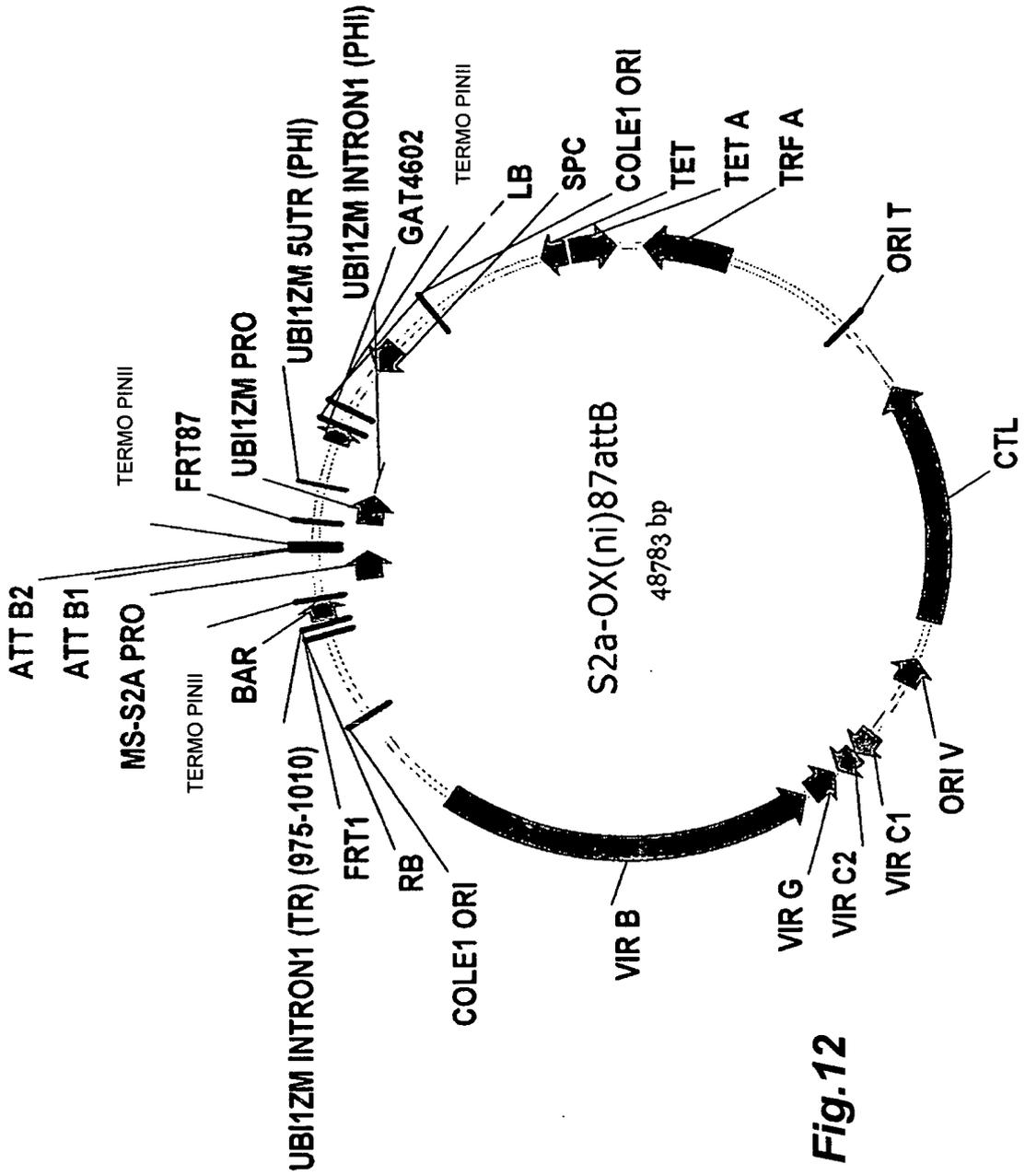


Fig.12

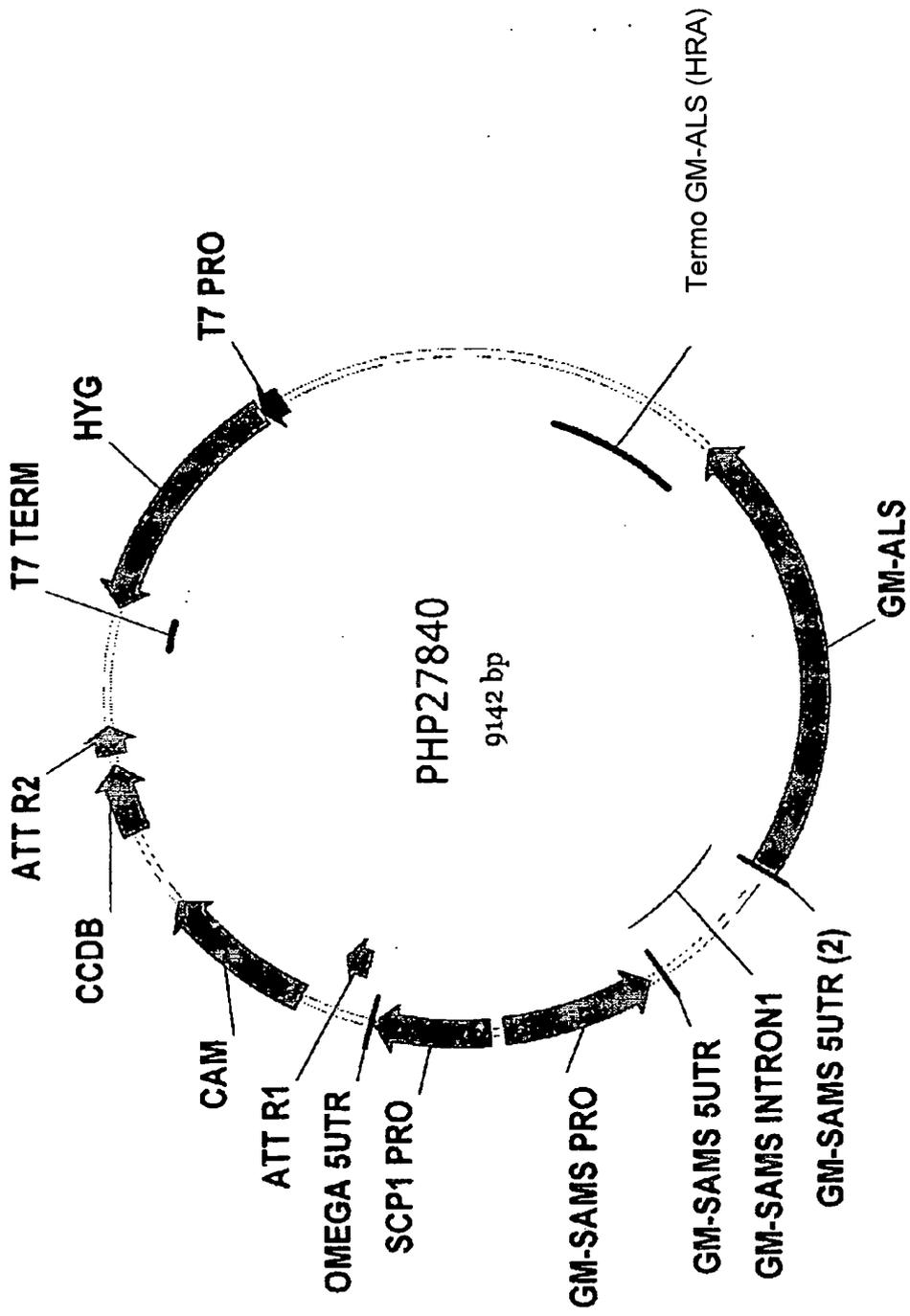


Fig.13

```

***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
SEQ ID NO: 52 MSPPLEPHDYIGLSAAAAAAPPPTPTSSSSSSSSSPA--PRLTLRLGLPGSESPDRDRDC
SEQ ID NO: 25 MSPPLEPHDYIGLSAAAAAAPPPTPTSSSSSSSSSPA--PRLTLRLGLPGSESPDRDRDC
SEQ ID NO: 34 MSPPLEPHDYIGLSAAAAAAPPPT--TSSSSSSSSSPA--PRLTLRLGLPGSESPDRDRDR
SEQ ID NO: 53 MSPPLEPHDYIGLSAAAAAAPPPTP--TSSSSSSSSSPA--PRLTLRLGLPGSESPDRDRDC
SEQ ID NO: 51 MSPPLEPHDYIGLSAAAAAAPTSSSSSSSPNPGGEARGPRLTLRLGLPGSESPER-----

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SEQ ID NO: 52 --CEDVAATLSLGLPAA---AAVSAKRAFPOPAQRPAGSKASDA-----KQQASPA
SEQ ID NO: 25 --CEDVAATLSLGLPAA---AAVSAKRAFPOPAQRPAGSKASDA-----KQQASPA
SEQ ID NO: 34 DRCEVAAALSLSLGLPATPKAPAAVSAKRAFPOPAQRPAGSKASDD-----KQ-ASPA
SEQ ID NO: 53 --CEDVAATLSLGLPAA---AAVSAKRAFPOPAQRPAGSKASDA-----KQQASPA
SEQ ID NO: 51 ---EVVAAGLTGLPPTTTKAAS---KRAFPDSSPRHGASSGSAVAAAAACQDKAAPAAA

*****
SEQ ID NO: 52 PPAAKAQVVGWPPVNRNRYRKNTLAAATASRSKAPAEAAASGAGPMYVKVSMGAPYLRKVD
SEQ ID NO: 25 PPAAKAQVVGWPPVNRNRYRKNTLAAATASRSKAPAEAAASGAGPMYVKVSMGAPYLRKVD
SEQ ID NO: 34 PPAAKAQVVGWPPVNRNRYRKNTLAASASRSKAPAEADAASAARPMYVKVSMGAPYLRKVD
SEQ ID NO: 53 PPAAK-----SKAPAEAAASGAGPMYVKVSMGAPYLRKVD
SEQ ID NO: 51 PPAAKAQVVGWPPVNRNRYRKNTLAASASKG--GEDKGTAEGLYVKVSMGAPYLRKVD

*****
SEQ ID NO: 52 IKMYSSYEDLSLALQKMFSCFIAGQGLHKSSKORLNTNGSKVDALKDQYVLTIEDKDA
SEQ ID NO: 25 IKMYSSYEDLSLALQKMFSCFIAGQGLHKSSKORLNTNGSKVDALKDQYVLTIEDKDA
SEQ ID NO: 34 IKMYSSYEDLSLALQKMFSCFIAGQGLHKSSKORLNTNGSKVDALKDQYVLTIEDKDA
SEQ ID NO: 53 IKMYSSYEDLSLALQKMFSCFIAGQGLHKSSKORLNTNGSKVDALKDQYVLTIEDKDA
SEQ ID NO: 51 LKMYSSYEDLSMALQKMFSCFITGQGLRKSNNRDLNTNGSKADALQDQYVLTIEDKDA

***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
SEQ ID NO: 52 DWMLVGDLPWDYFTSICRKLKIMRGSDAVGIAPRTVEQTGQNK
SEQ ID NO: 25 DWMLVGDLPWDYFTSICRKLKIMRGSDAVGIAPRTVEQTGQNK
SEQ ID NO: 34 DWMLVGDLPWDYFTSICRKLKIMRGSDAVGIAPRTIEQTGQNK
SEQ ID NO: 53 DWMLVGDLPWDYFTSICRKLKIMRGSDAVGIAPRTVEQTGQNK
SEQ ID NO: 51 DWMLVGDLPWDLFTTICRKLKIMRGSDAAGIAPRSIEQSGQSR

```

Fig.14

Percentual de identidade

	SEQ ID NO: Rum1 original	SEQ ID NO: RUM1 B73	SEQ ID NO: RML	SEQ ID NO: Rum1-R	SEQ ID NO: Rice seq
SEQ ID NO: Rum1 original		99.3	87.0	97.1	67.3
SEQ ID NO: RUM1 B73			87.0	97.1	67.3
SEQ ID NO: RML				88.9	68.6
SEQ ID NO: Rum1-R					66.3
SEQ ID NO: Sequência de arroz					

Fig.15

**Solução de Hoagland modificada – concentrações 16X para crescimento  
de milho semi-hidropônico**

Nutriente	1 mM KNO <sub>3</sub>	2 mM KNO <sub>3</sub>	3 mM KNO <sub>3</sub>	4 mM KNO <sub>3</sub>
KNO <sub>3</sub>	16 mM	32 mM	48 mM	64 mM
KCl	48 mM	32 mM	16 mM	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11 mM	11 mM	11 mM	11 mM
MgSO <sub>4</sub>	16 mM	16 mM	16 mM	16 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	16 mM	16 mM	16 mM	16 mM
Sprint 330	1,6 g/l	1,6 g/l	1,6 g/l	1,6 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	24 μM	24 μM	24 μM	24 μM
5 mM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8 μM	8 μM	8 μM	8 μM
5 mM ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8 M	8 μM	8 μM	8 μM
0,5 mM CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	800 nM	800 nM	800 nM	800 nM
0,5 mM H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	800 nM	800 nM	800 nM	800 nM

Diluir 16X com água da torneira e determinar o pH da mistura final.

Adicionar 3 a 12 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> caso o pH seja de mais de 6,5.

O pH ideal é de 5,0 a 5,5.

**Fig.16**

Efeito de diferentes concentrações de nitrato sobre o crescimento e desenvolvimento de linhagens de milho duro Gaspe Bay (vide exemplo 10C)

[nitrato]	raiz (g dwt)	broto (g dwt)	total vegetativo (g dwt)	espiga e casca (g dwt)	borla (g dwt)	rebento n°	rebento (g dwt)
1 semana após a emergência							
1 mM	0,070a	0,105b	0,175b				
2 mM	0,073a	0,137ab	0,209ab				
3 mM	0,056a	0,120ab	0,176ab				
4 mM	0,074a	0,157a	0,231a				
2 semanas após a emergência							
1 mM	0,331ab	0,544c	0,875c				
2 mM	0,266b	0,951b	1,217b				
3 mM	0,352a	1,171a	1,523a				
4 mM	0,303ab	1,209a	1,512a				
3 semanas após a emergência							
1 mM	0,757a	1,283b	2,040b	0,379c	0,239c	0,8c	0,080b
2 mM	0,785a	2,033a	2,819a	0,718a	0,363bc	2,3	0,506a
3 mM	0,664a	1,911a	2,574a	0,451bc	0,403ab	2,8ab	0,441a
4 mM	0,845a	2,129a	2,974a	0,650ab	0,506a	3,3a	0,688a
4 semanas após a emergência							
1 mM	0,842b	2,010b	2,852b	1,318b	0,677b	*	*
2 mM	1,493a	3,772a	5,265a	3,130a	1,018a	*	*
3 mM	1,232ab	3,563a	4,795a	3,060a	0,875ab	*	*
4 mM	1,010b	2,943a	3,952a	2,787a	0,891ab	*	*

\* Rebentos removidos três semanas após a emergência.

Os meios com letras similares não são diferentes por Menor Diferença Significativa (LSD) protegida (0,05).

**Fig.17**

**RESUMO**

**“PLANTA QUE COMPREENDE NO SEU GENOMA UMA  
CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, PLANTA, MÉTODOS  
DE ALTERAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ EM PLANTAS,  
MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA DE RAIZ EM  
5 PLANTAS, MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES DE  
UMA CARACTERÍSTICA AGRONÔMICA EM PLANTAS,  
POLINUCLEOTÍDEOS ISOLADOS E FRAGMENTOS DE ÁCIDO  
NUCLEICO ISOLADO”**

10 Polipeptídeos e polinucleotídeos isolados e construções de DNA  
recombinante particularmente úteis para a alteração da estrutura das raízes de  
plantas, composições (tais como plantas ou sementes) que compreendem  
essas construções de DNA recombinantes e métodos que utilizam essas  
construções de DNA recombinantes. A construção de DNA recombinante  
15 compreende um polinucleotídeo ligado operativamente a um promotor funcional  
em uma planta, em que o mencionado polinucleotídeo codifica um polipeptídeo  
útil para alterar a arquitetura de raiz das plantas.

Solução de Hoagland modificada – concentrações 16X para crescimento de milho semi-hidropônico

Nutriente	1 mM KNO <sub>3</sub>	2 mM KNO <sub>3</sub>	3 mM KNO <sub>3</sub>	4 mM KNO <sub>3</sub>
KNO <sub>3</sub>	16 mM	32 mM	48 mM	64 mM
KCl	48 mM	32 mM	16 mM	-----
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11 mM	11 mM	11 mM	11 mM
MgSO <sub>4</sub>	16 mM	16 mM	16 mM	16 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	16 mM	16 mM	16 mM	16 mM
Sprint 330	1.6 g/L	1.6 g/L	1.6 g/L	1.6 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	24 μM	24 μM	24 μM	24 μM
5 mM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8 μM	8 μM	8 μM	8 μM
5 mM ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	8 M	8 μM	8 μM	8 μM
0.5 mM CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	800 nM	800 nM	800 nM	800 nM
0.5 mM H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	800 nM	800 nM	800 nM	800 nM

Diluir 16X com água da torneira e determinar o pH da mistura final.  
Adicionar 3 a 12 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> caso o pH seja de mais de 6,5.  
O pH ideal é de 5,0 a 5,5

**Fig.16**

Efeito de diferentes concentrações de nitrato sobre o crescimento e desenvolvimento de linhagens de milho derivadas de milho duro Gaspe Bay (vide Exemplo 10C).

NITRATO	RAIZ	BROTO	TOTAL	ESPIGA	BORLA	REBENTO	REBENTO
	(g dwt)	(g dwt)	VEGETATIVO	E CASCA	(g dwt)	(g dwt)	(g dwt)
1 SEMANA APÓS A EMERGÊNCIA							
1 mM	0.070a	0.105b	0.175b				
2 mM	0.073a	0.137ab	0.209ab				
3 mM	0.056a	0.120ab	0.176ab				
4 mM	0.074a	0.157a	0.231a				
2 SEMANAS APÓS A EMERGÊNCIA							
1 mM	0.331ab	0.544c	0.875c				
2 mM	0.266b	0.951b	1.217b				
3 mM	0.352a	1.171a	1.523a				
4 mM	0.303ab	1.209a	1.512a				
3 SEMANAS APÓS A EMERGÊNCIA							
1 mM	0.757a	1.283b	2.040b	0.379c	0.239c	0.8c	0.080b
2 mM	0.785a	2.033a	2.819a	0.718a	0.363bc	2.3	0.506a
3 mM	0.664a	1.911a	2.574a	0.451bc	0.403ab	2.8ab	0.441a
4 mM	0.845a	2.129a	2.974a	0.650ab	0.506a	3.3a	0.688a
4 SEMANAS APÓS A EMERGÊNCIA							
1 mM	0.842b	2.010b	2.852b	1.318b	0.677b	*	*
2 mM	1.493a	3.772a	5.265a	3.130a	1.018a	*	*
3 mM	1.232ab	3.563a	4.795a	3.060a	0.875ab	*	*
4 mM	1.010b	2.943a	3.952a	2.787a	0.891ab	*	*

\* Rebentos removidos três semanas após a emergência  
Os meios com letras similares não são diferentes por Menor Diferença Significativa (LSD) protegida (0,05).

**Fig.17**