

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

(21) **PI0609713-8 A2**

(22) Data de Depósito: 24/03/2006

(43) Data da Publicação: 20/04/2010
(RPI 2050)



* B R P I 0 6 0 9 7 1 3 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*

A01H 5/00 (2010.01)

C12P 7/06 (2010.01)

C12N 15/82 (2010.01)

(54) Título: **MÉTODO PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO, MÉTODO PARA USAR SABUGOS DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA EM APLICAÇÕES DE CONVERSÃO DE BIOMASSA, E MÉTODO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO NUTRICIONAL DA RAÇÃO DE UM ANIMAL**

(30) Prioridade Unionista: 28/03/2005 US 60/665,695

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

(72) Inventor(es): JOHN STEFFENS, ROYSTON E. CARTER

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006010795 de 24/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/104891 de 05/10/2006

(57) Resumo: MÉTODO PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO, MÉTODO PARA USAR SABUGOS DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA EM APLICAÇÕES DE CONVERSÃO DE BIOMASSA, E MÉTODO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO NUTRICIONAL DA RAÇÃO DE UM ANIMAL. A presente invenção refere-se a métodos e constructos genéticos para o controle de expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina em plantas. O método envolve o uso de RNAi de filamento duplo para regular negativamente ou nocautear a expressão dos genes CAD e COMT. Em modalidades particulares, o método envolve o uso de promotores específicos para sabugo e preferidos para sabugo para regular negativamente a biossíntese de lignina nos sabugos de plantas de milho.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS E CONSTRUÇÕES GENÉTICAS PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO".

Reivindicação de Prioridade

- 5 Este pedido reivindica a prioridade do pedido de Patente US60/665.685, depositado em 28 de março de 2005, cuja exposição é aqui incorporada a título de referência.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia agrícola. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao uso de tecnologia de RNAi para modificar a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina no milho ("maize"), e mais especificamente em sabugos de milho.

Antecedentes da Invenção

Lignina é um polímero aromático heterogêneo complexo que torna as membranas impermeáveis e reforça as paredes de certas células das plantas.

- Lignina é formada por polimerização de radicais livres derivados de monolignóis, tais como álcoois paracumarílicos, coniferílicos e sinapílicos (Higuchi, 1985, em Biosynthesis and degradation of wood components (T. Higuchi, ed.), Academic Press, Orlando, Fla. pp. 141-160). A lignina é formada por polimerização de pelo menos três monolignóis diferentes que são sintetizados em uma via de multi-etapas, em que cada etapa na via é catalisada por uma enzima diferente. Tem sido mostrado que a manipulação de
- 25 várias cópias de genes que codificam certas enzimas, tais como álcool cinnamílico desidrogenase (CAD) e ácido caféico 3-O-metiltransferase (COMT) resulta na modificação da quantidade de lignina produzida; vide, por exemplo, Patente US5.451.514 e Publicação de PCT WO 94/23044. Além disso, tem sido mostrado que a expressão anti-sentido de seqüências que codifi-
- 30 cam CAD em choupo leva à produção de lignina tendo uma composição modificada (Grand, C, et al., Planta (Berl.) 163:232-237 (1985)).

Ligninas têm uma ampla variação em seu conteúdo relativo de

monolignóis, como função da espécie e dos vários tecidos dentro da mesma planta.

Essa variação é provavelmente causada e controlada por diferentes atividades e especificidades dos substratos, as enzimas necessárias para a biossíntese de monômeros de lignina (Higuchi, 1985, *loc. cit.*).

Além de seu papel na estrutura das plantas, a lignina representa um componente principal da biomassa terrestre e assume uma grande significância econômica e ecológica (Brown, 1985, *J. Appl. Biochem.* 7, 371-387; Whetten e Sederoff, 1995, *Forest Ecology and Management*, 43, 301-316).

No nível de exploração da biomassa, é apropriado primeiro notar que a lignina é um fator limitativo da digestibilidade e rendimento nutricional de plantas de forragem. De fato, está claramente demonstrado que a digestibilidade das plantas de forragem por ruminantes é inversamente proporcional ao tratamento do teor de lignina nestas plantas, em que a natureza das ligninas é também um fator determinante neste fenômeno (Buxton e Rous-
sel, 1988, *Crop. Sci.*, 28, 553-558; Jung e Vogel, 1986, *J. Anim., Sci.*, 62, 1703-1712).

Dentre as principais plantas para forragem nas quais seria de interesse reduzir os teores de lignina podem ser mencionados luzerna, capim-do-prado e forragem de milho usados para ensilagem.

Deve ser também observado que altos teores de lignina são, em parte, responsáveis pela limitada qualidade da torta de girassol destinada à alimentação de gado, e à redução das capacidades germinativas de certas sementes no setor hortícola.

Pode ser enfatizado que a lignificação intensa que resulta durante a conservação dos componentes da planta depois da colheita rapidamente rende produtos tais como aspargo, inhame, cenouras, etc. inadequados para consumo.

Além disso, é também apropriado notar que mais que 50 milhões de toneladas de lignina são extraídos de materiais lígneos, cada ano, no contexto da produção de polpa de papel na indústria de papel. Essa operação de extração, que é necessária para obter celulose, é dispendiosa em

energia, e, em segundo lugar, causa poluição através dos compostos químicos usados para a extração, que são encontrados no ambiente (Dean e Eriksson, 1992, *Holzforschung*, 46, 135-147; Whetten e Sederoff, 1991, *loc. cit.*).

- 5 Reduzir as proporções de ligninas (que perfazem até 20 a 30% da matéria seca, dependendo da espécie) para um pouco por cento (2 a 5%) representaria um aumento do rendimento e uma substancial economia (produtos químicos) e contribuiria para melhorar o ambiente (redução da poluição). Dada à escala de uso de material líneo, esses decréscimos teriam
- 10 repercussões extremamente significantes. Nesse caso, as espécies envolvidas seriam choupo, eucalipto, *Acacia magnium*, o gênero *Casuarina* e todos angiospermas e gimnospermas usados na produção de polpa de papel.

Está claro que nos dois setores em consideração, a redução dos níveis de ligninas deve ser moderada para preservar as características de rigidez e a arquitetura normal da planta (ou da árvore), já que as ligninas que reforçam as paredes celulares desempenham um significativo papel na manutenção do hábito ereto das plantas.

15

As variações naturais nos teores de lignina observados na natureza para as mesmas espécies (desvios que podem ser de até 6-8% da matéria secada entre os indivíduos) justificam as reduções sugeridas acima.

20

A resistência à degradação da lignina, como as dificuldades encontradas no contexto de sua extração, é provavelmente devida à estrutura complexa de seu polímero, que é feito de ligações de éter e ligações carbono-carbono entre os monômeros, bem como às numerosas ligações químicas que existem entre a lignina e os outros componentes da parede celular

25 (Sarkanen e Ludwig, 1971, em *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions* (K.V. Sarkanen e C. H. Ludwig ed.), Nova Iorque: Wiley—Interscience, pp. 1-18).

Uma abordagem para tentar reduzir o nível de ligninas em plantas por engenharia genética consistiria em inibir a síntese de uma das enzimas na cadeia da biossíntese dessas ligninas indicadas acima.

30

Uma técnica particularmente adequada no contexto de tal abor-

dagem é usar mRNA anti-sentido, que é capaz de hibridizar o mRNA, que codifica essas enzimas, e, conseqüentemente, previne, pelo menos em parte, a produção destas enzimas de seu mRNA correspondente.

5 Tal estratégia de anti-sentido efetuada com a ajuda do gene que codifica a CAD em tabaco foi o objeto do Pedido de Patente EP 584 117, que descreve o uso de mRNA anti-sentido que é capaz de inibir a produção de ligninas em plantas por hibridização com o mRNA, que codifica a CAD nessas plantas.

10 Os resultados nas plantas transformadas demonstram desse modo uma redução da atividade da CAD, mas paradoxalmente os teores de ligninas não mostraram alteração. Estudos complementares indicam que as ligninas de plantas transformadas são diferentes das ligninas de controle, já que os aldeídos cinamílicos são incorporados diretamente no polímero de lignina.

15 Milho "Brown mid rib" (Bmr) tem sido usado como alternativa para aperfeiçoar a digestibilidade para híbridos de ensilagem, por décadas. O aperfeiçoamento nas ingestões e digestibilidade de ruminantes é derivado do teor de lignina reduzido em híbridos mutados de Bmr. A mutação de Bm 1 é relativamente branda e causa poucos efeitos pleiotróficos, mas proporciona menos aperfeiçoamento na digestibilidade que Bm3, tem sido menos es-
20 tudado, e não tem sido comercialmente desenvolvido. A mutação de Bm3 é a característica de Bm mais bem estudada, ela proporciona características superiores de digestibilidade, mas à custa de desempenho agrônomo moderadamente pobre. Bm3 é a base da existência de produtos comerciais. A
25 característica de Bm1 é causada por atividade reduzida da enzima biossintética, CAD, e a característica de Bm3 é causada por atividade reduzida de uma enzima biossintética, COMT.

As seguintes referências de base são aqui incorporadas a título de referência: Patentes US 6.441.272; US 6.855.864; US 6.610.908; US
30 5.451.514; US 5.866.791; US 5.959.178; US 6.066.780; US 6.211.432; US 5.981.837; US 5.850.020; US 6.204.434; e US 6.610.521; Pedidos de Patente US20020081693 e US 20030159170; Pedidos PCT WO 2004080202; WO

03054229; Pedido de Patente EP 1425401; e Piquemal et al., *Plant Physiology* 130:1675 – 1685 (2002); Vignols et al., *The Plant Cell* 7:407-416 (1995); Morrow et al., *Molecular Breeding* 3:351 – 357 (1997). Essas referências discutem vários aspectos da biossíntese de lignina em plantas, e o controle delas. Em especial, as Patentes US 5.451.514; US 5.959.178; e US 6.606.780 são particularmente importantes com respeito ao ensinamento referente ao papel de expressão de CAD e de COMT na biossíntese de lignina em plantas.

Células e tecidos de plantas podem responder à lesão mecânica, química ou induzida por patógeno por produção de vários compostos fenólicos incluindo precursores de lignina mono ou dimetoxilada derivados de ácido cinâmico via uma série complexa de reações bioquímicas. Esses precursores de lignina são eventualmente usados pela planta para produzir o polímero de lignina que auxilia no reparo do ferimento por adição de hidrofbicidade, uma barreira física contra infecção por patógeno e resistência mecânica ao tecido lesionado (Vance, C. P., et al., 1980, *Annu Rev Phytopathol* 18:259-288). Biossíntese dos precursores de lignina mono ou dimetoxilada ocorrem, em parte, pela ação de duas enzimas, ácido caféico 3-O-metiltransferase (COMT), também conhecida como ácido caféico/5-hidroxiferúlico O-metiltransferase e cafeoil CoA 3-O-metiltransferase (CCOMT). Ambas as enzimas têm sido isoladas e purificadas a partir de uma ampla variedade de espécies de plantas.

Estudos mostraram que as atividades de COMT e CCOMT aumentam antes da deposição de lignina (Inoue, K., et al., *Plant Physiol* 117(3):761-770). A síntese de precursores de lignina envolve a metilação de ácido caféico para produzir ácido ferúlico seguido por 5-hidroxilação do ferulato, então uma segunda metilação para render sinapato. COMT está envolvida na metilação tanto do ácido caféico como do ácido 5-hidroxiferúlico (Inoue, K., et al., 1998, *Plant Physiol* 117(3):761-770). Pesquisa indica que transcritos de COMT estão presentes em altos níveis nos órgãos contendo tecido vascular e um estudo sugere que a inibição de anti-sentido de COMT pode levar ao teor de lignina e composição modificados no xilem ou floema

do tecido de planta transgênica (Dwivedi, U., et al., 1994, Plant Mol. Biol. 26:61-71).

Uma tecnologia promissora para obtenção de silenciamento de gene marcado é baseada em RNA de fita dupla (dsRNA) que induz reposta
 5 ao chamado silenciamento de gene pós-transcricional ou de interferência de RNA (RNAi). RNA de fita dupla foi introduzido em várias espécies diferentes, incluindo nematódeos, moscas de frutas, *Tripanossoma*, fungos, plantas. Vide, por exemplo, WO9932619. Algum sucesso limitado tem sido também demonstrado em mamíferos, especificamente em ocitos e embriões de ca-
 10 mundongo. A introdução do dsRNA apropriado inibe a expressão de gene em uma modo dependente de sequência, um efeito que tem sido usado extensivamente em *C. elegans* e em *D. melanogaster* como uma ferramenta genética para estudar a função do gene. Por exemplo, 00/01846 descreve métodos para caracterizar a função do gene usando inibição de dsRNA.
 15 Contudo, a inibição de dsRNA tem sido aplicada com pouco sucesso em sistemas de mamíferos.

Por causa da importância das ligninas na arquitetura da parede celular e digestibilidade, e por causa da agronomia desfavorável de milho Bmr, há considerável interesse nos prospectos para alterar a quantidade ou
 20 a qualidade de lignina por engenharia genética. Assim, há um grande acordo de interesse na identificação dos genes que codificam proteínas envolvidas na produção de lignina em plantas e na modificação da expressão de tais genes, por exemplo, pelo uso de métodos de RNAi. Esses métodos podem ser usados em células de planta para controlar a produção de lignina. Tais
 25 métodos teriam significativa utilidade na produção de material de planta com aperfeiçoada digestibilidade, e se direcionados ao decréscimo do teor de lignina dos sabugos de milho, poderiam evitar o aspecto inferior agrônômico do fenótipo de Bmr.

Sumário da Invenção

30 A presente invenção proporciona métodos e construções de expressão genética úteis no controle da biossíntese de lignina em plantas, e particularmente em milho, e mais particularmente nos sabugos das plantas

de milho. Em um exemplo específico, a tecnologia de RNAi de fita dupla é utilizada para diminuir a expressão de (ou para nocautear) tanto os genes de álcool cinamílico desidrogenase (CAD) do milho como os genes de ácido caféico O-metil transferase (COMT) do milho. Modalidades preferidas envolvem os genes nocaute CAD ou COMT especificamente no sabugo de milho para reduzir o teor de lignina. Isso proporcionará digestibilidade aperfeiçoada de fibra não digerível no sabugo, que aperfeiçoaria a digestibilidade da planta inteira por ruminantes. Limitando a expressão das características similares a BM somente ao sabugo, o tecido mais altamente lignificado, proporcionaria ainda aumento atrativo na digestibilidade da planta toda, mas mitigaria a maior parte do risco associada ao pobre desempenho agrônômico, tais como depósito aumentado e pobre rendimento de matéria seca, como ocorre com mutações de Bmr, que está associado à sua expressão sistêmica. Portanto, os eventos de nocaute de CAD ou de COMT foram gerados usando tecnologia de RNAi de fita dupla com OsMAD6, um promotor específico de sabugo.

A presente invenção refere-se a um método para controlar a biossíntese de lignina em uma planta, em que o método compreende infra-regular a expressão de uma enzima na planta, a enzima selecionada do grupo que consiste em CAD e COMT, em que a infra-regulação é obtida usando RNAi de fita dupla. O método refere-se também à infra-regulação de expressão de ambas as enzimas; às construções de dsRNAi; e às construções específicas para sabugo/preferidas para sabugo. A presente invenção refere-se também ao uso dos sabugos, com baixo teor de lignina, produzidos utilizando o método da invenção em aplicações de conversão de biomassa (por exemplo, na produção de etanol) e em aplicações de ração (por exemplo, em ração de animal para produção aumentada de leite, particularmente vacas leiteiras).

Breve Descrição dos Desenhos

30 A figura 1 é uma representação do plasmídeo pSyn12210.

A figura 2 é uma representação do plasmídeo pSyn12345.

A figura 3 é um gráfico mostrando que conforme o teor de lignina

aumenta, a digestibilidade de material de sabugo diminui.

Descrição Detalhada

Definições

5 Para clareza, certos termos usados no relatório descritivo são definidos e apresentados como a seguir:

"Associado a/operativamente ligado" refere-se às duas seqüências de ácido nucléico que estão relacionadas física ou funcionalmente. Por exemplo, um promotor ou seqüência de DNA reguladora é dito estar "associado a" uma seqüência de DNA que codifica um RNA ou a uma proteína se
10 as duas seqüências estão operativamente ligadas, ou situadas de modo que a seqüência de DNA reguladora afetará o nível de expressão da codificação ou da seqüência de DNA estrutural.

Uma "construção quimérica" é uma seqüência de ácidos nucléicos recombinantes na qual um promotor ou seqüência de ácidos nucléicos reguladora é operativamente ligada ou associada a uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica mRNA ou que é expressa como uma proteína, de modo que a seqüência de ácidos nucléicos reguladora é capaz de regular a transcrição ou expressão da seqüência de ácido nucléicos associada. A seqüência de ácidos nucléicos reguladora da construção quimérica é normalmente operativamente ligada à seqüência de ácidos nucléicos associada,
15 como encontrada na natureza.

Co-fator: reagente natural, tal como molécula orgânica ou íon metal, requerido em uma reação catalisada por enzima. Um co-fator é, por exemplo, NAD(P), riboflavina (incluindo FAD e FMN), folato, molibdoproteína, tiamina, biotina, ácido lipóico, ácido pantotênico e coenzima A, S-adenosilmetionina, piridoxal fosfato, ubiquinose, menaquinona. Opcionalmente, um co-fator pode ser regenerado e re-usado.
25

Uma "seqüência de codificação" é uma seqüência de ácidos nucléicos que é transcrita em RNA tal como mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, RNA sentido ou RNA anti-sentido. Preferivelmente, o RNA é então traduzido em um organismo para produzir uma proteína.
30

Complementar: "complementar" refere-se a duas seqüências de

nucleotídeos que compreendem seqüências de nucleotídeos anti-paralelas capazes de emparelhamento, uma com a outra, mediante formação de ponte de hidrogênio entre os resíduos de base complementares nas seqüências de nucleotídeos anti-paralelas.

- 5 Atividade enzimática: significa aqui a capacidade de uma enzima em catalisar a conversão de um substrato em um produto. Um substrato para a enzima compreende o substrato natural da enzima, mas também compreende análogos do substrato natural, que podem ser também convertidos pela enzima em um produto ou em um análogo de um produto. A atividade da enzima é medida, por exemplo, por determinação da quantidade do produto na reação depois de certo período de tempo, ou por determinação da quantidade de substrato que permanece na mistura reacional depois certo período de tempo. A atividade da enzima é também medida por determinação da quantidade de um co-fator da reação, não usado, que permanece na
- 10 mistura reacional depois de certo período de tempo ou por determinação da quantidade de co-fator usado na mistura reacional depois de certo período de tempo. A atividade da enzima é também medida por determinação da quantidade de um doador de energia livre ou molécula rica em energia (por exemplo, ATP, fosfoenolpiruvato, fosfato de acetila ou fosfocreatina) que
- 15 permanece na mistura reacional depois de certo período de tempo ou por determinação da quantidade de um doador usado de energia livre ou molécula rica em energia (por exemplo, ADP, piruvato, acetato ou creatina) na
- 20 mistura reacional depois de certo período de tempo.

- Cassete de Expressão: "Cassete de expressão", como usado
- 25 aqui, significa uma molécula de ácido nucléico capaz de direcionar a expressão de uma particular seqüência de nucleotídeos em uma célula hospedeira apropriada, compreendendo um promotor operativamente ligado à seqüência de interesse, que está operativamente ligada a sinais de terminação. Ela também compreende, tipicamente, seqüências requeridas para tradução
- 30 própria da seqüência de nucleotídeo. A região de codificação codifica usualmente uma proteína de interesse, mas pode também codificar um RNA funcional de interesse, por exemplo, RNA anti-sentido ou RNA não traduzi-

do, na direção sentido e anti-sentido. O cassete de expressão que compreende a seqüência de nucleotídeos de interesse por ser quimérico, significando que pelo menos um de seus componentes é heterólogo com respeito ao pelo menos um de seus outros componentes. O cassete de expressão podem ser também um que ocorre naturalmente, mas que tenha sido obtido em uma forma recombinante útil para expressão heteróloga. Tipicamente, contudo, o cassete de expressão é heterólogo com respeito ao hospedeiro, isto é, a seqüência de DNA particular do cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e deve ter sido introduzida na célula hospedeira ou um ancestral da célula hospedeira por evento de transformação. A expressão da seqüência de nucleotídeos no cassete de expressão pode estar sob o controle de um promotor constitutivo ou de um promotor induzível que inicia a transcrição somente quando a célula hospedeira é exposta a algum estímulo externo. No caso de um organismo multicelular, tal como planta, o promotor pode ser também específico para um tecido particular ou órgão ou estágio de desenvolvimento.

Gene: o termo "gene" é usado amplamente com referência a qualquer segmento de DNA associado a uma função biológica. Assim, genes incluem seqüências de codificação e/ou seqüências reguladoras para sua expressão. Os genes incluem também segmentos de DNA não expressos que, por exemplo, formam seqüências de reconhecimento para outras proteínas. Os genes podem ser obtidos de uma variedade de fontes, incluindo clonagem de uma fonte de interesse ou sintetização de uma informação de seqüência conhecida ou predita, e pode incluir seqüências desenhadas para terem parâmetros desejados.

Heterólogo/exógeno: Os termos "heterólogos" e "exógenos", quando usados aqui, referem-se a uma seqüência de ácidos nucléicos (por exemplo, uma seqüência de DNA) ou um gene, referem-se a uma seqüência que se origina de uma fonte estranha à célula hospedeira particular ou, se da mesma fonte, é modificada de sua forma original. Assim, um gene heterólogo em uma célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira particular, mas tem sido modificado através de, por exemplo, o

uso de DNA shuffling. Os termos podem incluir também cópias múltiplas que não ocorrem naturalmente de uma seqüência de DNA que ocorre naturalmente. Assim, os termos referem-se a um segmento de DNA que é estranho ou heterólogo à célula, ou homólogo às células, mas em uma posição dentro do ácido nucléico da célula hospedeira e onde o elemento não é comumente encontrado. Segmentos de DNA exógeno são expressos para produzir polipeptídeos exógenos.

Uma seqüência de ácidos nucléicos "homóloga" (por exemplo, DNA) é uma seqüência de ácidos nucléicos (por exemplo, DNA) naturalmente associada a uma célula hospedeira na qual ele é introduzida.

Hibridização: A fase "hibridizar especificamente para" refere-se à ligação, duplexação, ou hibridização de uma molécula somente para uma seqüência de nucleotídeos particular sob condições severas quando essa seqüência está presente em um DNA ou RNA de mistura complexa (por exemplo, célula total). "Ligação(ções) substancialmente" refere-se à hibridização complementar entre um ácido nucléico de sonda e um ácido nucléico alvo e engloba desconformidades que podem ser acomodadas por redução da severidade dos meios de hibridização para obter a detecção desejada da seqüência de ácidos nucléicos alvo.

Inibidor: uma substância química que inativa a atividade enzimática de uma proteína tal como enzima biossintética, receptor, proteína de transdução de sinal, produto gênico estrutural, ou proteína de transporte. O termo "herbicida" (ou "composto herbicida") é usado aqui para definir um inibidor aplicado a uma planta em qualquer estágio de desenvolvimento, por meio de que a o herbicida inibe o crescimento da planta ou mata a planta.

Interação: qualidade ou estado de ação mútua de modo que a eficácia ou toxidez de uma proteína ou composto em uma outra proteína seja inibidora (antagonistas) ou intensificadora (agonistas).

Uma seqüência de ácidos nucléicos é "isocodificadora com" uma seqüência de ácidos nucléicos de referência quando a seqüência de ácidos nucléicos codifica um polipeptídeo tendo a mesma seqüência de aminoácidos que o polipeptídeo codificado pela seqüência de ácidos nucléicos de

referência.

Isogênico: plantas que são geneticamente idênticas, exceto pelo fato de que elas podem diferir pela presença ou ausência de uma sequência de DNA heteróloga.

5 Isolado: no contexto da presente invenção, uma molécula de DNA isolada ou uma enzima isolada é uma molécula de DNA ou enzima que, pela mão do homem, existe separada de seu ambiente nativo e não é, portanto, um produto da natureza. Uma molécula de DNA ou enzima isolada pode existir em uma forma purificada ou pode existir em um ambiente não
10 nativo, tal como, por exemplo, em uma célula hospedeira transgênica.

Proteína madura: proteína da qual o peptídeo de trânsito, peptídeo de sinal, e/ou porções de propeptídeo foram removidos.

Promotor mínimo da menor peça de um promotor, tal como um elemento TATA, que pode suportar qualquer transcrição. Um promotor mínimo
15 tem tipicamente atividade de promotor, altamente reduzida, em ausência de ativação a montante. Em presença de um fator de transcrição adequado, o promotor mínimo funciona para permitir transcrição.

Atividade de enzima modificada: atividade enzimática diferente daquela que ocorre naturalmente em uma planta (isto é, atividade enzimática
20 que ocorre naturalmente na ausência de manipulação direta ou indireta de tal atividade pelo homem), que é tolerante a inibidores que inibem a atividade enzimática que ocorre naturalmente.

Nativo: refere-se a um gene presente no genoma de uma célula de planta não transformada.

25 Ocorrência natural: o termo "ocorrência natural" é usado para descrever um objeto que pode ser encontrado na natureza como distinto de ser artificialmente produzido pelo homem. Por exemplo, é de ocorrência natural uma proteína ou sequência de nucleotídeos presente em um organismo (incluindo um vírus), que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que
30 foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório.

Ácido nucléico: o termo "ácido nucléico" refere-se a desorribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros destes tanto na forma de fita

simples como de fita dupla. A menos que especificamente limita, o termo engloba ácidos nucléicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais, que têm propriedades de ligação similares ao ácido nucléico de referência e são metabolizados de um modo similar aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que de outro modo indicado, uma seqüência de ácidos nucléicos, particular, também engloba implicitamente suas variantes modificadas conservativamente (por exemplo, substituições de códon degenerado) e seqüências complementares e bem como na seqüência explicitamente indicada. Especificamente, substituições de códons degenerados podem ser obtidas por geração de seqüências, nas quais a terceira posição de um ou mais (ou todos) códons selecionados é substituída com resíduos de bases mistas e/ou de desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Os termos "ácido nucléico" ou "seqüências de ácidos nucléicos" podem ser também usados intercambiavelmente com gene, cDNA, e mRNA codificado por um gene.

"ORF" significa quadro aberto de leitura.

Identidade percentual: as fases "porcentagem idêntica" ou "porcentagem idêntica" no contexto de duas seqüências de ácidos nucléicos ou proteínas, refere-se preferivelmente a duas ou mais seqüências ou subsequências que têm, por exemplo, 60%, preferivelmente, 70%, mais preferivelmente 80%, ainda mais preferivelmente 90%, mesmo mais preferivelmente 95%, e de maior preferência pelo menos 99% de identidade de resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos, quando comparadas ou alinhadas para correspondência máxima, conforme medição usando um dos seguintes algoritmos de comparação de seqüência ou inspeção visual. Preferivelmente, a identidade em porcentagem existe ao longo de uma região das seqüências que tem pelo menos cerca de 50 resíduos de comprimento, mais preferivelmente ao longo uma região de pelo menos cerca de 100 resíduos, e mais preferivelmente a identidade em porcentagem existe ao longo de pelo menos 150 resíduos. Em uma modalidade especialmente preferida, a presente identidade existe ao longo de todo o comprimento das regiões de codificação.

Para comparação de seqüências, tipicamente uma seqüência age como uma seqüência de referência com a qual seqüências de teste são comparadas. Quando se usa um algoritmo de comparação de seqüências, as seqüências de teste e de referencia são inseridas em um computador, as

5 coordenadas de subsequências são designadas se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmo de seqüência são designados. O algoritmo de comparação de seqüências calcula então a identidade de porcentagem de seqüência para a(s) seqüência(s) de teste com a seqüência de referência, com base nos parâmetros de programa designados.

10 O alinhamento ótimo de seqüências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), pela busca por método de similaridade de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. E.U.A. 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Pacote de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, Wis.), ou por

15 inspeção visual (vide genericamente, Ausubel et al., abaixo).

Exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a

20 identidade de seqüências em porcentagem e similaridade de seqüências é o algoritmo BLAST, que é descrito por Altschul et al, J. Mo. Biol. 215:403-410 (1990). Software para realizar a análise de BLAST está publicamente disponível no National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esse algoritmo envolve os primeiros pares

25 de seqüências de classificação alta de identificação (HSPs) por identificação de palavras curtas de comprimento W na seqüência de questões, que ou correspondem ou satisfazem alguma classificação T de limite com valor positivo quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento em uma seqüência da base de dados. T é referido como o limite de classificação de

30 palavras da vizinhança (Altschul et al., 1990). Esses acertos de palavras na vizinhança iniciais agem como sementes para iniciar buscas para encontrar HSPs mais longas contendo estas. Os acertos de palavras são então esten-

didos em ambas as direções ao longo de cada seqüência para a classificação até a classificação de alinhamento cumulativo poder ser aumentada. Classificações cumulativas são calculadas usando, por exemplo, para seqüências de nucleotídeos, os parâmetros M (classificação de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre >0) e N (classificação de penalidade para resíduos que desconcorrespondentes; sempre <0). Para seqüências de aminoácidos, uma matriz de classificação é usada para calcular a classificação cumulativa. Extensão dos acertos de palavras em cada direção é interrompida, quando o alinhamento cumulativo cai da quantidade X de seu valor máximo conseguido, a classificação cumulativa vai para zero ou abaixo devido à acumulação de um ou mais alinhamentos de resíduos de classificação negativa, ou o final de qualquer das seqüências é atingido. Os parâmetros de algoritmo BLAST W, T, e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para seqüências de nucleotídeos) usa padrões de comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um corte de 100, $M=5$, $N=4$, e uma comparação de ambas as fitas. Para seqüências de aminoácidos, o programa BLASTP usado como padrões um comprimento palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10 e a matriz de classificação BLOSUM62 (vide Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.: 10915 (1989)).

Além de calcular a identidade de seqüência em porcentagem, o algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas seqüências (vide, por exemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 90: 5873-5787 (1993)). Uma medição de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma ($P(N)$), que proporciona uma indicação da probabilidade pela qual uma correspondência entre duas seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos ocorreria por acaso. Por exemplo, uma seqüência de ácidos nucléicos de teste é considerada similar a uma seqüência de referência se a menor probabilidade de soma em um comparação da seqüência de ácidos nucléicos com a seqüência de ácidos nucléicos de referência for menor que cerca de 0,1, mais preferivelmente menor que cerca de 0,01, e de maior preferência menor que cerca de 0,001.

0,001.

Pré-proteína: proteína que é normalmente marcada para uma organela celular, tal como um cloroplasto, e ainda compreende seu peptídeo de trânsito nativo.

- 5 Purificado: o termo "purificado", quando aplicado a um ácido nucléico ou proteína, denota que o ácido nucléico ou a proteína está essencialmente isenta de outros componentes celulares com os quais ele(ela) é associado(a) no estado natural. Está preferivelmente em um estado homogêneo embora possa estar em uma solução seca ou aquosa. Pureza e homogeneidades são tipicamente determinadas usando técnicas de química analítica tal como eletroforese de gel de poliacrilamida ou cromatografia líquida de alto desempenho. Uma proteína que é a espécie predominante em uma preparação está substancialmente purificada. O termo "purificado" denota que um ácido nucléico ou proteína gera essencialmente uma banda em um
- 10 gel eletroforético. Particularmente, isso significa que o ácido nucléico ou a proteína é pelo menos cerca de 50% pura, mais preferivelmente cerca de pelo menos 85% pura, e de maior preferência pelo menos cerca de 99% pura.

- Dois ácidos nucléicos são "recombinados" quando seqüências
- 20 de cada um dos dois ácidos nucléicos são combinadas em um ácido nucléico progênie. Duas seqüências são "diretamente" recombinadas quando ambos os ácidos nucléicos são substratos para recombinação. Duas seqüências são "recombinadas indiretamente" quando as seqüências são recombinadas usando um intermediário tal como um oligonucleotídeo de permuta.
- 25 Para recombinação indireta, não mais que uma das seqüências é um substrato real para recombinação, e em alguns casos, nenhuma seqüência é um substrato para recombinação.

- "Elementos reguladores" referem-se às seqüências envolvidas no controle da expressão de uma seqüência de nucleotídeos. Elementos reguladores compreendem um promotor operativamente ligado à seqüência
- 30 de nucleotídeos de interesse e sinais de terminação. Eles também englobam tipicamente seqüências requeridas para tradução da seqüência de nucleotí-

deos.

Aumento significativo: um aumento significativo da atividade enzimática que é maior que a margem de erro na técnica de medição, preferivelmente um aumento de cerca de 2 vezes ou mais da atividade do tipo de enzima do tipo selvagem em presença do inibidor, mais preferivelmente um aumento de cerca de 5 vezes ou mais, e de maior preferência um aumento de cerca de 10 vezes ou mais.

Significativamente menor: significa que a quantidade de um produto de uma reação enzimática é reduzida de maior que a margem de erro inerente à técnica de medição, preferivelmente um decréscimo de cerca de 2 vezes ou mais da atividade da enzima do tipo selvagem em ausência do inibidor, mais preferivelmente um decréscimo de cerca de 5 vezes ou maior, e de maior preferência um decréscimo de cerca de 10 vezes ou maior.

Ligação específica/Reatividade Cruzada Imunológica: Uma indicação de que duas seqüências de ácidos nucleicos ou de proteínas são substancialmente idênticas é que a proteína codificada pelo primeiro ácido nucleico apresenta reatividade imunologicamente cruzada com ou se liga especificamente à proteína codificada pelo segundo ácido nucleico. Assim, uma proteína é típica e substancialmente idêntica a uma segunda proteína, por exemplo, se as duas proteínas diferem somente por substituições conservadoras. A frase "especificamente (ou seletivamente) se liga a um anticorpo", ou "especificamente (ou seletivamente) imunorreativo com", quando com referência a uma proteína ou peptídeo, refere-se a uma reação de ligação que é determinante da presença da proteína em presença de uma população heterogênea de proteínas e outras substâncias biológicas. Assim, sob condições de imunoensaio designadas, os anticorpos especificados se ligam a uma proteína particular e não se ligam em uma quantidade significativa às outras proteínas presentes na amostra. Ligação específica para um anticorpo sob tais condições pode requerer um anticorpo que é selecionado quanto a sua especificidade para uma particular proteína. Por exemplo, anticorpos gerados para a proteína com a seqüência de aminoácidos codificada por quaisquer das seqüências de aminoácidos da invenção podem ser selecio-

nados para obter anticorpos especificamente imunorreativos com aquela proteína e não com outras proteínas exceto para variantes polimórficas. Uma variedade de formatos de imunoensaio pode ser usada para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos com uma proteína particular. Por exemplo, imunoensaios Elis em fase sólida, Western blots, ou imunoistoquímica são rotineiramente usados para selecionar anticorpos monoclonais especificamente imunorreativos com uma proteína. Vide Harlow e Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nova Iorque ("Harlow and Lane"), para descrição de formatos de imunoensaios e condições que podem ser usadas para determinar imunorreatividade específica. Tipicamente, uma reação específica ou seletiva é de pelo menos duas vezes o sinal de fundo ou de ruído e mais tipicamente acima de 10 a 100 vezes de fundo.

"Condições de hibridização severas" e "condições de lavagem de hibridização severas" no contexto dos experimentos de hibridização de ácidos nucleicos tais como hibridizações Southern and Northern são dependentes de sequência, e são diferentes sob parâmetros ambientais diferentes. Sequências mais longas hibridizam especificamente em temperaturas mais altas. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é dado por Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nova Iorque. Geralmente, condições de hibridização e de lavagem severas são selecionadas para serem de 5°C inferiores ao ponto de fusão térmico (T_m) para a sequência específica em uma resistência iônica e pH definidos. Tipicamente, sob "condições severas" uma sonda hibridizará para sua subsequência alvo, mas não para outras sequências.

A T_m é a temperatura (sob resistência iônica e pH definidos) em cujos 50% da sequência alvo hibridiza para um sonda perfeitamente correspondida. Condições muito severas são selecionadas para serem iguais à T_m para uma sonda particular. Um exemplo de condições de hibridização severas para hibridização de ácidos nucleicos complementares, que têm mais

que 100 resíduos complementares em um filtro em um Southern ou Northern blot é 50% de formamida com 1 mg de heparina, a 42°C, com a hibridização sendo efetuada durante a noite. Um exemplo de condições de lavagem altamente severas é NaCl 0,15M a 72°C, por cerca de 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem severas é 0,2 vez SSC a 65°C, por 15 minutos (vide, Sambrook, abaixo, para uma descrição de tampão de SSC). Frequentemente, lavagem de alta severidade é precedida de uma lavagem de baixa severidade para remover sinal de sonda de fundo. Um exemplo de lavagem de severidade média para um duplex de, por exemplo, mais que 100 nucleotídeos, 1 vez de SSC a 45°C, por 15 minutos. Um exemplo de lavagem de baixa severidade para um duplex de, por exemplo, mais que 100 nucleotídeos, é de 4 a 6 vezes de SSC, a 40°C, por 15 minutos. Para sondas curtas (por exemplo, cerca de 10 a 50 nucleotídeos), condições severas envolvem tipicamente concentrações de sal de menos que cerca de íon Na 0,1M, tipicamente cerca de 0,01 a 1,0M de concentração de íon Na (ou outros sais), em pH 7,0 a 8,3, e a temperatura é tipicamente pelo menos cerca de 30°C. Condições severas podem ser também obtidas com a adição de agentes desestabilizantes tal como formamida. Em geral, uma razão de sinal para ruído de 2 vezes (ou mais) que aquela observada para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridização particular indica detecção de uma hibridização específica. Ácidos nucleicos que não hibridizam para quaisquer outras condições severas são ainda substancialmente idênticos se as proteínas que eles codificam forem substancialmente idênticas. Isso ocorre, por exemplo, quando uma cópia é criada usando a degenerescência máxima de códon permitida pelo código genético.

Os seguintes são exemplos de condições de hibridização/lavagem que podem ser usadas para clonar seqüências de nucleotídeos que são homólogos das seqüências de nucleotídeos de referência da presente invenção: uma seqüência de nucleotídeos de referência hibridiza preferivelmente para a seqüência de nucleotídeos de referência em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 2 vezes de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, mais desejavelmente em dodecil

- sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO_4 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 1 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, mais desejavelmente em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO_4 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 0,5 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, preferivelmente em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO_4 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 0,1 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, mais preferivelmente em dodecil sulfato de sódio a 7% (DSD), NaPO_4 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 0,1 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 65°C.

- "Subseqüência" refere-se a uma seqüência de ácidos nucléicos ou de aminoácidos que compreende uma parte de uma seqüência mais longa de ácidos nucléicos ou de aminoácidos (por exemplo, proteína), respectivamente.

- Substrato: um substrato é a molécula que uma enzima reconhece naturalmente e converte em um produto na via bioquímica na qual a enzima efetua naturalmente a sua função, ou é uma versão modificada da molécula, que é também reconhecida pela enzima e é convertida pela enzima em um produto, em uma reação enzimática similar à reação que ocorre naturalmente.

- Transformação: um processo para introduzir DNA heterólogo em uma célula de planta, um tecido de planta, ou planta. Células de planta, tecido de planta ou plantas transformadas devem ser entendidas como englobando não somente o produto final de um processo de transformação, mas também sua progênie transgênica.

- "Transformado", "transgênico" e "recombinante" referem-se a um organismo hospedeiro tal como bactéria ou planta onde uma molécula de ácido nucléico heterólogo tenha sido introduzida. A molécula de ácido nucléico pode estar estavelmente integrada no genoma do hospedeiro ou a molécula de ácido nucléico pode estar também presente como uma molécula extracromossomial. Tal molécula extracromossomial pode ser autorreplicadora. Células, tecidos e plantas transformados devem ser entendidos como englobando não somente o produto final de um processo de transformação, mas também a progênie deste. Um hospedeiro "não transformado",

"não transgênico", ou "não recombinante" refere-se a um organismo do tipo selvagem, por exemplo, uma bactéria ou planta, que não contém a molécula de ácido nucléico heterólogo.

5 Viabilidade: "viabilidade", com usada aqui, significa um parâmetro de ajuste de uma planta. As plantas são ensaiadas para seu desempenho homozigoto do desenvolvimento da planta, indicando que as plantas são essenciais para o crescimento da planta.

10 Alteração da expressão de uma seqüência de nucleotídeos de presente invenção é também obtida por interferência de dsRNA conforme descrição no WO 99/32619, WO 99/53050 ou WO 99/61631, todos aqui incorporados a título de referência em sua totalidade. Em uma outra modalidade, a alteração da expressão de uma seqüência de nucleotídeos da presente invenção, preferivelmente a redução de sua expressão, é obtida por interferência de RNA de fita dupla (dsRNA). A totalidade ou, preferivelmente, 15 uma porção de uma seqüência de nucleotídeos da presente invenção está compreendida em uma molécula de DNA. O tamanho da molécula de DNA é preferivelmente de 100 a 1.000 nucleotídeos ou mais; o tamanho ótimo a ser determinado empiricamente. Duas cópias da molécula de DNA idênticas são ligadas, separadas por uma molécula de DNA espaçador, de modo que a 20 primeira e a segunda cópias estejam em orientações opostas. Na modalidade preferida, a primeira cópia de molécula de DNA está no complemento reverso (também conhecido como fita de não-codificação) e a segunda cópia é a fita de codificação; na modalidade mais preferida, a primeira cópia é a fita de codificação, e a segunda cópia é o complemento reverso. O tamanho 25 da molécula de DNA espaçador é preferivelmente de 200 a 10.000 nucleotídeos, mais preferivelmente 400 a 5.000 nucleotídeos e de maior preferência de 600 a 1.500 nucleotídeos de comprimento. O espaçador é preferivelmente uma peça aleatória de DNA, mais preferivelmente uma peça aleatória de DNA com homologia para o organismo alvo para a interferência de dsRNA, e 30 de maior preferência uma intron funcional que é efetivamente unido pelo organismo alvo. As duas cópias da molécula de DNA separadas pelo espaçador são operativamente ligadas a um promotor funcional em uma célula de

planta, e introduzidas em uma planta, onde a sequência de nucleotídeos é expressável. Em uma modalidade preferida, a molécula de DNA que compreende a sequência de nucleotídeos, ou uma porção desta, é estavelmente integrada ao genoma da célula de planta.

5 Em uma outra modalidade preferida, a molécula de DNA compreendendo a sequência de nucleotídeos, ou uma porção desta, está compreendida em uma molécula de replicação extracromossomal. Várias publicações que descrevem essa abordagem são citadas para posterior ilustração (Waterhouse et al. (1998) PNAS 95:13959-13964; Chuang e Meyerowitz
10 (2000) PNAS 97:4985-4990; Smith et al. (2000) Nature 40:319-320). A alteração da expressão de uma sequência de nucleotídeos por interferência de dsRNA está também descrita em, por exemplo, WO 99/32619, WO 99/53050 ou WO 99/61631, todas estas aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade.

15 Nas plantas transgênicas que contêm uma das moléculas de DNA descritas imediatamente acima, a expressão da sequência de nucleotídeos correspondente à sequência de nucleotídeos compreendida na molécula de DNA é preferivelmente reduzida. Preferivelmente, a sequência de nucleotídeos na molécula de DNA é pelo menos 70% idêntica à sequência de
20 nucleotídeos, cuja expressão é reduzida, mais preferivelmente ela é pelo menos 80% idêntica, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% idêntica, ainda de maior preferência pelo menos 95% idêntica, de ainda maior preferência pelo menos 99% idêntica.

Controle de Expressão de Gene em Plantas Transgênicas

25 A invenção refere-se ainda às células transformadas que compreendem as moléculas de ácido nucléico, plantas transformadas, sementes, e partes de plantas, e métodos para modificar as características fenotípicas de interesse por alteração da expressão dos genes da invenção.

A. Modificação das Sequências de Codificação e Sequências Adjacentes

30 A expressão transgênica em plantas de genes derivados de fontes heterólogas pode envolver a modificação daqueles genes para obter e otimizar sua expressão em plantas. Em particular, ORFs bacterianos que

codificam enzimas separadas, mas que são codificados pelo mesmo transcrito no micróbio nativo, são mais bem expressos em plantas em transcritos separados. Para obtenção disto, cada ORF microbiano é isolado individualmente e clonado dentro de um cassete que proporciona uma sequência de

5 promotores de planta na extremidade 5' do ORF e uma terminador transcricional de planta na extremidade 3' do ORF. A sequência de ORFs isolada inclui preferivelmente o códon ATG iniciador e o códon STOP terminador, mas pode incluir sequência adicional além do códon ATG iniciador e do STOP. Além disso, o ORF pode estar truncado, mas ainda retém a atividade

10 requerida; para ORFs longos, versões truncadas que retém atividade podem ser preferíveis para expressão em organismos transgênicos. "Promotor de planta" e "terminador transcricional de planta" significam promotores e terminadores transcricionais que operam dentro das células de planta. Isso inclui promotores e terminadores de transcrição que podem ser derivados de fontes não-plantas tais com vírus (um exemplo é o Vírus Mosaico da Couve-

15 Flor).

Em alguns casos, a modificação das sequências de codificação de ORF e da sequência adjacente não é requerida. É suficiente isolar um

20 fragmento contendo o ORF de interesse e inseri-lo a jusante de um promotor de planta. Por exemplo, Gaffney et al. (Science 261: 754-756 (1993)) expressaram o gene nahG de *Pseudomonas* em plantas transgênicas sob o controle do promotor CaMV 35S e o terminador CaMV tml com sucesso sem modificação da sequência de codificação e com nucleotídeos de gene de *Pseudomonas* a montante do ATG ainda ligado, e nucleotídeo a jusante do

25 códon STOP ainda ligado ao ORF de nahG. Preferivelmente, uma pequena sequência microbiana adjacente deve ser deixada a montante do ATG e a jusante do códon STOP. Na prática, tal construção pode depender da disponibilidade de sítios de restrição.

Em outros casos, a expressão de genes derivados de fontes microbianas pode proporcionar problemas na expressão. Esses problemas foram bem caracterizados na técnica e são particularmente comuns com genes derivados de certas fontes como *Bacilos*. Esses problemas podem se

30

aplicar à sequência de nucleotídeos desta invenção, e a modificação desses genes pode ser efetuada por técnicas agora bem conhecidas da arte. Os seguintes problemas podem ser encontrados:

1. Uso de Códon.

- 5 O uso de códon preferido em plantas difere do uso de códon preferido em certos microrganismos. Comparação do uso de códons dentro de um ORF microbiano clonado com o uso em genes de plantas (e em particular genes da planta alvo) possibilitará uma identificação dos códons dentro do ORF, que seria preferivelmente alterado. Tipicamente, a evolução da
- 10 planta tende a uma forte preferência dos nucleotídeos C e G na terceira posição de base de monocotiledôneas, ao passo que as dicotiledôneas frequentemente usam os nucleotídeos A ou T nesta posição. Com a modificação de um gene para incorporar uso de códon preferido para uma espécie transgênica alvo particular, muitos dos problemas descritos abaixo relativos
- 15 ao teor de GC/AT e splice ilegítimo serão superados.

2. Teor de GC/AT

- Genes de plantas têm tipicamente um teor de GC de mais que 35%. As sequências de ORFs que são ricas em nucleotídeos A e T podem causar vários problemas nas plantas. Em primeiro lugar, acredita-se que
- 20 motivos de ATTTA provocam a desestabilização das mensagens e são encontrados na extremidade 3' de muitos mRNAs de vida curta. Em segundo lugar, acredita-se que a ocorrência de sinais de poliadenilação tal como AA-TAAA em posições inapropriadas dentro da mensagem causa truncação prematura de transcrição. Além disso, monocotiledôneas podem reconhecer
- 25 sequências ricas em AT em sítios de splice (vide abaixo).

3. Sequências Adjacentes à Metionina de Iniciação

- As plantas diferem dos microrganismos em que suas mensagens não possuem um sítio de ligação de ribossomo definido. Mais exatamente, acredita-se que ribossomos se liguem à extremidade 5' da mensagem e faça uma varredura para o primeiro ATG disponível, no qual a
- 30 translação começa. Contudo, acredita-se que existe uma preferência por certos nucleotídeos adjacentes ao ATG e que a expressão de genes microbianos

pode ser intensificada pela inclusão de um iniciador de tradução de consenso eucariótico no ATG. Clontech (catálogo de 1993/1994, página 210, aqui incorporado a título de referência) sugeriu uma sequência como um iniciador de tradução de consenso para a expressão do gene uidA da *E. coli* em plantas. Ainda, Joshi (N.A.R. 15: 6643-6653 (1987), incorporado aqui a título de referência) comparou muitas sequências de plantas com o ATG e sugere uma outra sequência de consenso. Em situações onde dificuldades são encontradas na expressão dos ORFs microbianos em plantas, a inclusão de uma dessas sequências no ATG de iniciação podem aperfeiçoar a tradução.

10 Em tais casos, os últimos três nucleotídeos do consenso podem não ser apropriados para inclusão na sequência modificada devido à sua modificação do segundo resíduo AA. Sequências preferidas adjacentes à metionina de iniciação podem diferir entre espécies de plantas diferentes. Uma investigação em 14 genes de milho localizados no banco de dados GenBank forneceram os resultados:

15

1 Posição Antes do ATG de Iniciação em 14 Genes de Milho:

-10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 C 3 8 4 6 2 5 6 0 10 T 3 0 3 4 3 2 1 1 1 0 A 2 3 1
4 3 2 3 7 2 3 G 6 3 6 0 6 5 4 6 1 5

Essa análise pode ser efetuada para as espécies de plantas desejadas, nas quais a sequência de nucleotídeos está sendo incorporada, e a sequência adjacente ao ATG modificado para incorporar os nucleotídeos preferidos.

20

4. Remoção de Sítios Splice Ilegítimos

Genes clonados de fontes não-planta e não otimizados para expressão em plantas podem conter também motivos que podem ser reconhecidos na plantas como sítios de splice 5' e 3', e ser clivados, gerando, assim, mensagens truncadas ou deletadas. Esses sítios podem ser removidos usando-se técnicas bem conhecidas da arte.

25

Técnicas para a modificação de sequências de codificação e sequências adjacentes são bem conhecidas da arte. Nos casos em que a expressão inicial de um ORF microbiano é baixa e é considerada apropriada para fazer alterações na sequência conforme descrito acima, então a cons-

30

trução de genes sintéticos pode ser obtida de acordo com os métodos bem conhecidos na técnica. Esses são, por exemplo, descritos nas descrições de patentes publicadas EP 0 385 962 (Monsanto), EP 0 359 472 (Lubrizol) e WO 93/07278 (Ciba-Geigy), todas as quais são aqui incorporadas a título de referência. Na maioria dos casos, é preferível ensaiar a expressão de construções de gene usando protocolos de ensaios transitórios (que são bem conhecidos da técnica) antes de sua transferência para as plantas transgênicas.

B. Construção de Cassetes de Expressão de Plantas

10 Seqüências de codificação destinadas à expressão em plantas transgênicas são inicialmente montadas em cassetes de expressão atrás de um promotor adequado expressável em plantas. O cassete de expressão pode compreender também quaisquer seqüências adicionais requeridas ou selecionadas para a expressão do transgene. Tais seqüências incluem, mas
15 sem restrição, terminadores de transcrição, seqüências estranhas para intensificar a expressão tais como introns, seqüências vitais, e seqüências destinadas para a marcação do produto gênico a organelas específicas e compartimentos de células. Esses cassetes de expressão podem ser então
20 facilmente transferidos para os vetores de transformação de plantas descritos abaixo. O seguinte é uma descrição de vários componentes de cassetes de expressão típicos.

1. Promotores

25 A seleção do promotor usado nos cassetes de expressão determinará o padrão de expressão espacial e temporal do transgene na planta transgênica. Promotores selecionados expressarão transgenes em específicos tipos de células (tais como células epidérmicas de folha, células mesófilas, células do córtex de raiz,) ou em tecidos ou órgãos específicos (raízes, folhas ou flores, por exemplo) e a seleção refletirá a localização desejada do acúmulo do produto gênico. Alternativamente, o promotor selecionado pode
30 conduzir a expressão do gene sob várias condições indutoras. Os promotores variem em sua resistência, isto é, capacidade de promover transcrição. Dependendo do sistema de célula hospedeira utilizado, qualquer um de vá-

rios promotores adequado pode ser usado, incluindo o promotor nativo de gene. Os seguintes são exemplos não limitativos de promotores que podem ser usados nos cassetes de expressão.

a. Expressão Constitutiva, a Promotor de Ubiquitina:

5 A ubiquitina é um produto gênico conhecido por se acumular em vários tipos de células e seu promotor tem sido clonado de várias espécies para uso em plantas transgênicas (por exemplo, girassol – Binet et al., Plant Science 79: 87-94 (1991); milho – Christensen et al., Plant Molec. Biol. 12: 619-632 (1989); e *Arabidopsis* – Callis et al., J. Biol. Chem. 265: 12486-10 12493 (1990) e Norris et al., Plant Mol. Biol. 21: 895-906 (1993)). O promotor de ubiquitina de milho tem sido desenvolvido em sistemas de monocotiledônea transgênica e sua seqüência e vetores construídos para transformação de monocotiledôneas são descritos na Patente EP 0 342 926 (Lubrizol), que é aqui incorporada a título de referência. Taylor et al. (Plant Cell Rep. 12: 15 491495 (1993)) descrevem um vetor (pAHC25) que compreende um promotor de ubiquitina de milho e primeiro intron e sua alta atividade em suspensões de células de várias monocotiledôneas, quando introduzido via bombardeio de microprojéteis. O promotor de ubiquitina de *Arabidopsis* é ideal para uso com as seqüências de nucleotídeos da presente invenção. O 20 promotor de ubiquitina é adequado para expressão de gene em plantas transgênicas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Vetores adequados são derivados de pAHC25 ou quaisquer dos vetores de transformação descritos neste pedido, modificados pela introdução do promotor de ubiquitina apropriado e/ou seqüências de introns.

25 b. Expressão Constitutiva, o Promotor CaMV 35S:

Construção do plasmídio pCGN1761 é descrita no pedido de patente EP 0 392 225 (Exemplo 23), que é aqui incorporado a título de referência. pCGN1761 contém o promotor CAMV 35 S "duplo" e o terminador transcricional tml com um sítio EcoRI único entre o promotor e o terminador 30 e tem a estrutura principal do tipo pUC. Um derivado de pCGN1761 é construído tendo um poli-ligante modificado que inclui sítios NtoI e XhoI, além do sítio EcoRI, existente. Esse derivado é designado pCGN1761ENX.

pCGN1761ENX é útil para clonar seqüências de cDNA ou seqüências de codificação (incluindo seqüências de ORFs microbianos) dentro de seu poli-ligante com a finalidade de sua expressão sob o controle do promotor 35S em plantas transgênicas. O cassete de promotor 35S-seqüência de codificação-terminador tml de tal construção pode ser excisado pelos sítios 5' HindIII, SphI, Sall, e XbaI para o promotor e sítios 3' XbaI, BamHI e BglII para o terminador para transferência para vetores de transformação tais como aqueles descritos abaixo. Além disso, o fragmento de promotor 35S duplo pode ser removido por excisão 5' com HindIII, SphI, Sall, XbaI, ou PstI, e excisão 3' com quaisquer sítios de restrição de poli-ligante (EcoRI, NotI ou XhoI) para substituição com um outro promotor. Se desejado, modificações em torno dos sítios de clonagem podem ser feitas pela introdução de seqüências que podem intensificar a tradução. Isso é particularmente útil quando a super-expressão é desejada. Por exemplo, pCGN1761ENX pode ser modificado por otimização do sítio de iniciação traducional como descrito no Exemplo 37 da Patente US5.639.949, aqui incorporada a título de referência.

c. Expressão Constitutiva, o Promotor de Actina:

Várias isoformas de actina são conhecidas por expressarem na maioria dos tipos de células e, conseqüentemente, o promotor de actina é uma boa escolha para um promotor constitutivo. Em particular, o promotor proveniente do gene Act1 de arroz foi clonado e caracterizado (McElroy et al., Plant Cell 2: 163-171 (1990)). Verificou-se que um fragmento de 1,3 kb do promotor continha todos os elementos reguladores requeridos para expressão em protoplastos de arroz. Além disso, numerosos vetores de expressão de arroz com base no promotor Act1 têm sido construídos especificamente para uso em monocotiledôneas (McElroy et al., Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)). Esses incorporam o Act1-intron 1, seqüências flanqueadora 5' de Adh1 e Adh1-intron 1 (do gene de álcool de milho desidrogenase) e seqüência do promotor CaMV 35S. Os vetores mostrando a maior expressão foram as fusões de 35S e Act1 intron ou a seqüência flanqueadora 5' de Act1 intron e o Act1 intron. Otimização das seqüências em torno do ATG iniciador

(do gene repórter GUS) também intensificou a expressão. Os cassetes de expressão de promotor descritos por McElroy et al. (Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)) podem ser facilmente modificados para expressão de genes e são particularmente adequados para uso em hospedeiros de monocotiledônea. Por exemplo, fragmentos contendo promotor são removidos das construções de McElroy e usados para repor o promotor 35s duplo em pCGN1761ENX, que é então disponível para a inserção de seqüências de genes específicos. Os genes de fusão assim construídos podem ser então transferidos para vetores de transformação apropriados. Em um relatório separado, foi constatado que o promotor de Act1 com seu primeiro intron direciona alta expressão em células de cevada cultivadas (Chibbar et al., Plant Cell Rep. 12: 506-509 (1993)).

d. Expressão Induzível, Promotores PR-1:

O promotor 35S em pCGN1761ENX pode ser substituído com qualquer outro promotor de escolha que resultará em níveis de expressão adequadamente altos. A título de exemplo, um dos promotores quimicamente reguláveis descritos na Patente US5.614.395, tal como o promotor PR-1 de tabaco, pode substituir o promotor 35S duplo. Alternativamente, o promotor PR-1 de *Arabidopsis* descrito por Lebel et al., Plant J. 16: 223-233 (1998) pode ser usado. O promotor de escolha é preferivelmente excisado de sua fonte por enzimas de restrição, mas pode ser alternativamente amplificado por PCR usando iniciadores que contêm sítios de restrição terminal, apropriados. Se a amplificação de PCR for efetuada, então o promotor deve ser reseqüenciado para checagem de erros de amplificação depois da clonagem do promotor amplificado no vetor alvo. O promotor PR-1a regulável quimicamente ou por patógeno é clivado do plasmídio pCIB1004 (para construção, vide Exemplo 21 da EP 0332 104, que é aqui incorporada a título de referência) e transferido para o plasmídio pCGN1761ENX (Uknes et al., Plant Cell 4: 645-656 (1992)). pCIB1004 é clivado com NcoI e o resultante 3' projetando-se do fragmento linearizado é tornado cego por tratamento com T4 DNA polimerase. O fragmento é então clivado com HindIII e o fragmento contendo o promotor PR-1a, resultante, é purificado em gel e clonado para

pCGN1761ENX, do qual o promotor 35S duplo foi removido. Isso é feito por clivagem com XhoI e tornado cego com T4 polimerase, seguido por clivagem com HindIII e isolamento do fragmento contendo terminador de vetor maior no qual o fragmento de promotor pCIB1004 é clonado. Isso gera um derivado de pCGN1761ENX com o promotor PR-1a e o terminador tml e um poliligante intermédio com sítios únicos EcoRI e NotI. A sequência de codificação selecionada pode ser inserida nesse vetor, e os produtos de fusão (isto é, promotor-gene-terminador) podem ser subsequentemente transferidos para qualquer vetor de transformação selecionado, inclusive aqueles descritos, abaixo. Vários reguladores químicos podem ser empregados para induzir a expressão da sequência de codificação selecionada nas plantas transformadas de acordo com a presente invenção, incluindo o benzotiazol, ácido isonicotínico, e compostos de ácido salicílico descritos nas Patentes US 5.523.311 e US 5.614.395.

15 e. Expressão Induzível, um Promotor Induzível de Etanol:

Um promotor induzível por certos álcoois e cetonas, tal como etanol, podem ser também usados para conferir expressão induzível de uma sequência de codificação da presente invenção. Tal promotor é, por exemplo, um promotor de gene *alcA* de *Aspergillus nidulans* (Caddick et al. (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180). Em *A. nidulans*, o gene *alcA* codifica álcool desidrogenase 1, cuja expressão é regulada pelos fatores de transcrição em presença do indutor químico. Para os propósitos da presente invenção, as sequências de codificação de CAT em plasmídio *palcA:CAT* compreendendo uma sequência de promotores de gene *alcA* fundida a um promotor 35a mínimo (Caddick et al. (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180) são substituídas por uma sequência de codificação da presente invenção para formar uma casete de expressão tendo a sequência de codificação sob o controle do promotor de gene *alcA*. Isso é efetuado usando métodos bem conhecidos da técnica.

30 f. Expressão Induzível, um Promotor Induzível por Glicocorticóide:

A indução de expressão de uma sequência de ácidos nucleicos da presente invenção usando sistemas com base em hormônios esteróides

é também contemplada. Por exemplo, um sistema de indução mediado por glicocorticóide é usado (Aoyama e Chua (1997) *The Plant Journal* 11: 605-612) e expressão de gene é induzida por aplicação de um glicocorticóide, por exemplo, um glicocorticóide sintético, preferivelmente dexametasona, preferivelmente em uma concentração que varia de 0,1mM a 1mM, mais preferivelmente de 10mM a 100mM. Para os propósitos da presente invenção, as seqüências de genes de luciferase são substituídas por uma seqüência de ácidos nucleicos da invenção para formar um cassete de expressão tendo uma seqüência de ácidos nucleicos da invenção sob o controle de seis cópias de seqüências ativadoras a montante de GAL4 fundidas ao promotor 35S mínimo. Isso é efetuado usando métodos bem conhecidos da técnica. O fator de transação compreende o domínio de ligação de DNA GAL4 (Keegan et al. (1986) *Science* 231: 699-704) fundido ao domínio de trans-ativação da proteína viral de herpes VP16 (Triezenberg et al. (1988) *Genes Devel.* 2: 718-729) fundido ao domínio de ligação do receptor de glicocorticóide de rato (Picard et al. (1988) *Cell* 54: 1073-1080). A expressão da proteína de fusão é controlada por qualquer promotor adequado para expressão em plantas conhecido da técnica ou descrito aqui. Esse cassete de expressão é também compreendido na planta compreendendo uma seqüência de ácidos nucleicos da invenção fundida a 6 vezes GAL4/promotor mínimo. Assim, especificidade de tecido ou órgão da proteína de fusão é obtida levando à especificidade de tecido ou órgão induzível da toxina inseticida.

g. Expressão Específica para Raiz

Um outro padrão de expressão de gene é a expressão de raiz. Um promotor para raiz, adequado, é o promotor do gene similar à metalotioneína do milho (MTL) descrito por de Framond (*FEBS* 290: 103-106 (1991)) e também na Patente US5.466.785, aqui incorporada a título de referência. Esse promotor "MTL" é transferido para um vetor adequado tal como pCGN1761ENX para a inserção de um gene selecionado e transferência subsequente do inteiro cassete de promotor-gene-terminador para um vetor de transformação de interesse.

h. Promotores Induzíveis por Ferimento:

Promotores induzíveis por ferimento podem ser também adequados para expressão de gene. Numerosos de tais promotores têm sido descritos (por exemplo, Xu et al. *Plant Molec. Biol.* 22: 573-588 (1993), Longemann et al. *Plant Cell* 1: 151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, *Plant Molec. Biol.* 22: 783-792 (1993), Firek et al., *Plant Molec. Biol.* 129-142 (1993), Warner et al., *Plant J.* 3: 191-201 (1993)) e todos são adequados para uso com a presente invenção. Longeman et al. descrevem as seqüências a montante 5' do gene *wun1* da batata dicotiledônea. Xu et al. mostram que um promotor induzível de ferimento da batata de dicotiledônea (*pin2*) é ativa no arroz monocotiledôneo. Ainda, Rohrmeier & Lehle descrevem a clonagem do cDNA *Wipl* de milho, que é um ferimento induzido e que pode ser usado para isolar o promotor cognato usando técnicas padrão. Similarmente, Firek et al. e Warner et al. descreveram um gene induzido da *Asparagus officinalis* monocotiledônea, que é expressa no ferimento local e sítios de invasão de patógenos.

Usando técnicas de clonagem bem conhecidas da técnica, esses promotores podem ser transferidos para vetores adequados, fundidos aos genes pertencentes a esta invenção, e usados para expressar estes genes nos sítios de ferimento da planta.

20 i. Expressão Preferida da Medula

Pedido de Patente WO 93/07278, que é aqui incorporado a título de referência, descreve o isolamento do gene *trpA* do milho, que é preferencialmente expresso em células de medula. A seqüência de genes e o promotor se prolongando até -1726 bp do início da transcrição são apresentados. Usando técnicas padrão de biologia molecular, esse promotor ou partes dele podem ser transferidos para um vetor tal como pCGN171, onde ele pode repor o promotor 35S e pode ser usado para conduzir a expressão de um gene estranho em um modo preferido para medula. De fato, fragmentos contendo o promotor preferido para medula ou partes dele podem ser transferidos para qualquer reator e modificados para utilidade em plantas transgênicas.

J. Expressão Específica para Folha:

- Um gene de milho que codifica fosfoenol carboxilase (PEPC) foi descrito por Hudspeth & Grula (Plant Molec Biol 12: 579-589 (1989)). Usando técnicas padrão de biologia molecular, o promotor para esse gene pode ser usado para conduzir a expressão de qualquer gene em um modo específico para folha em plantas transgênicas.

k. Expressão Específica para Pólen:

- WO 93/07278 descreve o isolamento do gene de proteína quina- se depende de cálcio (CDPK) do milho, que é expresso em células de pólen. A sequência de genes e promotor se estendendo até 1.400 bp do início da transcrição. Usando técnicas padrão de biologia molecular, esse promotor ou partes dele foram transferidos para um vetor tal como pCGN1761, onde ele substitui o promotor 35S e pode ser usado para conduzir a expressão de uma sequência de ácidos nucleicos da invenção em um modo específico para pólen.

l. Expressão Específica para Sabugo:

- O promotor OsMADs6, isolado de arroz, é um promotor específico para sabugo de milho, tendo a sequência:

ctaggacgatggtgtgatgtggaacacgaagaaacatgaggaaaaatattaaatgaattcccacttaaatgcatca
aataaaaaataaagaaacgaccgggaatagacacagggttgaactagctagggcaaacatcatatggtcccttgc
gatgcacaagtacattgagatgtcattcaattctgtgcatcatatgcatgtggtcccttgcgaatattactcttgaatatctac
cagtgccaatctattgcatgacttaattaattcacagggtttgtgattacattattagtaagcttgagagcacaagctcaatggat
tttctataaatgggatcattttgcaatttcttgcgtgcaaaagtagccttctttactacttctgttttaatatagatccta
ttgacttttggcatatatttaacctgtatcttatttagatgtttgcgcaaatataataccttcaatgataaaattagtacaatga
aacaatgatatttacgcaattcttttactaaacaagtcacaagaagtagcctgcagcaatataatgttggaaccgtgcagtagat
cgagcctagctacgcaaaaaacaaaaagagaaaaaagggaaggaaaacattaatcatgcatgagcagtagtgcctg
gcaactggaattgtcaaagatatggggagaggagaataatacaagtactactactacctagctctaccatgcatatgcacc
caaaggcaaaactggattattggataaagcacagatgctggcaaaacaatccttaagcctcccctcctgcttcttattttg
gcagcctctaccggacgggtgccgtggtccattggaccagtaggtggcgacatacatggttgggttaagctagagagca
gtgtgtgtgcgcgcaagagagagagactgtgagtctgggagtagccctctcccctccttggccatcttctcgtgtatat
gcataatgcatcatcgcaacgggtatattgtgtgtggcggtgtggcattggattgccccatttggctcgtgtccca
gttaggttaaacctgtgtgtaaacctgtagccccacgcaaaagtacccttcttattgtgaaaggagaggaggtgtgtg
aattgtgatggaggagagagagagagatagaaagagagatgtgtgtcaagcaagcaagaaccagttcacaaagag

ctactactagtagtactgtactactgtgtacagtgcccaatgtcctttccggactcgactccactaataattctccttctcgc
 gggctcgttatattctcgtcatcattggaggcttagcaagcaagaagaggcagtggtgggtggaggaggagc
 tagctagcctgtgcttgctgacggctgagctgaggaatcgttcgacgacggcgagtcgacgaggggaagagtga
 gctgaggcgcatcgagaacaagatcaacaggcaggcaccttctccaagcgccgaacggcctcctcaagaaggcctac
 gagctgtccgttctcgtcgacgccgaggtcgcgtcatcatcttccagccggcgcaagctctacgagttcggcagcgcc
 gggataattaatacagacacaacaacacacaaccaacaaccagcatcaattgaacctgcagatctgctgtttctcig
 atcaattgcttcttttttcttcttcttcttcttctgctgcaacggcgctcctgctcctctgggggttctcgttttcttcttattat
 ttttagcaggtgccaaagtagccgagctactatacttacctggccatgtaattattttatccgctgtctgtgtgtgtgcata
 ctactatagggacatggcgcggtgttctataaaccgggagggccgcatccctaactagcatgggaggatatctttcagcgg
 atctatacaaaacctactcctgctgaccttcttctccagtttctccgggtcttcttggtattatttgccatcttccgggtgtg
 cgtgtgtcagagacagctcgaacgataaatttcaaaaccagtagagagggtgtgtgtgtgtgagaactgagtgagg
 agttagcatgaaggctgcaaactagaaggaggtatgttcttctttgatccatcaggggagccctctggtattaaagat
 ctttccggcacattgatttctactttgtgatgccctggaagaatcggcgtagcagcgtagcaccgctccatttggcttctac
 cctcacctccccatgciatgaactgatcaatttcttcttctacaccttctccttagcttccacttctcctggtatctatgcca
 tgttctcagcatgaatcaaatttaattcgtgttcttacttccatatacttggaagaaatttaattagatctattttgctcgggag
 gtcttctactttaggttctgatgccatcaccttatttcccccccccttcttcttctatcttcttctcctcatcttggcttgatctt
 gatctgtcagttatagcatgatgcatttcaatttgactgtatgtaagtcaaccggaaatatgttgatgatttctatatacaa
 cacttgatgtcaggcctgcacgttcttctgcttgggtgtgtggccaaaattgtctatatttgatcttcttcttctcctcattt
 atgacgattcctactacggcttaaacatttcttatttcttactaatcatgtagtcttactccttagtttctgtagctcaa
 cttggagatctttcattatttgcttagttgggtgggtacgttgtgacagatctaaaaagggtgcacgaaaagtttacttattatgaa
 aaaaggagcttaaacagggtatttcttatttctgtgatgacatttcttctgataagggggatttttataatcgcactcac
 atgtttatatgtaaaatctagcttcttcttcttggcatatttcccgctaagtagagttatgtggataacattataactttca
 agatccaatccacatcttctgattgtgaaaatcatacaatagggaatcaactgaagggttaattagatgctatatgcataata
 tataatgtgcgcgcgcgcgcgcctgaatttaactatgtatgcaccaactgttctcattgaaaaagatttgatatttctcagctatt
 cttttcagatataatataatgtttcaatctgtttgaccattataagataaagcctataattcaccaggcatttgagatgatctttc
 atgcatgaaaaagctgttgttacttcaactaaccagacgatctaactgtattgtataagaaacagaccttgatttctctt
 gtaaaatcatgcatgtgtcgtttgaattggagtcggcgccgtgtttgaccgtcaggaaagcttttttccctgaatagt
 caagggtctacttctgaagcaattgggacactaatcaattattgtttacctcggaccatcttttcttctcaccactaat
 cagtttatgccttggaccattaatgtgtgttcacaagcttctgtttatggtttacaaagcattcgcctagattgtgtgtgtct
 acacatcgatcacttttaataactgtcgttctcagttattcttttaacgtttggttattatcttatttaaaaaaattatcgtattattt
 attttgtgtgattactttattatcaaaagtatttcaaatatgacttattttttataagtgcactaattttcaataagatgaatgg
 tcaaatgttacaagaaaaagtaagcaaccactaatttagggcgaggtagtaaaacctagttattgtaaccaataattttatc
 aatctataaatgcaacacaaagtcacttctgtatctcacacaaagccacttcaacgatgaaagctgactgcatgttttatca
 aaacacatgtgatcagttgttgatgaaaaaattatctatgtcataaatcaagagttataatataagcttctggctctacaagt

aacatttctatgttttttttacgttcttacatactatgttttgccaaaaaacatgatcatttgttgacgaaaagaataagtaaa
 tatagagtgcctttgatacattataataagcttctgcctctataataacatctatgcacttttacgtcgtagtaattgatata
 tgagaaatttacatataacattttgtgcagcataaccacc

Esse promotor é um promotor preferido para uso na presente invenção.

2. Terminadores Transcricionais

5 Uma variedade de terminadores transcricionais está disponível para uso em cassetes de expressão. Esses são responsáveis pela terminação da transcrição além do transgene e correta poliadenilação de mRNA. Terminadores transcricionais apropriados são aqueles que são conhecidos por funcionarem em plantas e incluem o terminador CaMV 35S, o terminador tml, o terminador de nopalina sintase e o terminador rbcS E9 de ervilha. Es-
 10 ses podem ser usados tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas. Além disso, um terminador de transcrição de gene nativo pode ser usado.

3. Seqüências para Intensificação ou Regulação de Expressão

15 Numerosas seqüências foram encontradas para intensificar a expressão de gene de dentro da unidade transcricional e essas seqüências podem ser usadas em conjunto com os genes desta invenção para aumentar sua expressão em plantas transgênicas.

Várias seqüências de introns têm sido mostradas para intensifi-
 car expressão, particularmente em células monocotiledôneas. Por exemplo,
 20 verificou-se que os introns do gene Adhl de milho intensificam significante-
 mente a expressão do gene do tipo selvagem sob seu promotor cognato
 quando introduzido em células de milho. Verificou-se que intron 1 é de ex-
 pressão particularmente eficaz e intensificada em construções de fusão com
 o gene cloranfenicol acetiltransferase (Callis et al., Genes Develop. 1:1183-
 25 1200 (1987)). No mesmo sistema experimental, o intron do gene bronze1 de
 milho tinha um efeito similar em intensificar expressão. Seqüências de in-
 trons têm sido rotineiramente incorporadas em vetores de transformação de
 planta, tipicamente dentro do líder não traduzido.

Várias seqüências líder não traduzidas derivadas de vírus são
 30 também conhecidas por intensificarem expressão, e estas são particular-

- mente eficazes em células dicotiledôneas. Especificamente, seqüências líder de vírus de Mosaico do Tabaco (TMV, a seqüência W"), Vírus de Mosqueado Clorótico de Milho (MCMV), Vírus de Mosaico de Alfafa (AMV) mostraram ser eficazes na intensificação de expressão (por exemplo, Gallie et al., Nucl. Acids. Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski et al. Plant Molec. Biol. 15: 65079 (1990)). Outras seqüências líder conhecidas da técnica incluem, mas sem limitação: líderes picornavírus, por exemplo, líder EMCV (região de não-codificação 5' da encefalomiocardite) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., e Moss, B. PNAS USA 86:6126-6130 (1989)); líderes potyvírus, por exemplo, líder TEV (Vírus "Etch" do Tabaco) (Allison et al., 1986); líder MDMV (Vírus do Mosaico de Nanismo do Milho): Virologia 154:9-20); líder de proteína de ligação de cadeia pesada da imunoglobulina (BiP), (Macejak, D.G., e Sarnow, P., Nature 353: 90-94 (1991); líder não traduzido do mRNA de proteína de revestimento do vírus de mosaico da alfafa (AMV RNA 4), (Jobling, S.A., e Gehrke, L., Nature 325:622-625 (1987); líder do vírus do mosaico do tabaco (TMV), (Gallie, D.R. et al., Molecular Biology of RNA, páginas 237-256 (1989); e Vírus de Mosqueado Clorótico do Milho (MCMV) (Lommel, S.A., et al., Virology 81:382-385 (1991). Vide também, Della Cioppa et al., Plant Physiology 84:965-968 (1987).
- Além de incorporar um ou mais dos elementos mencionados acima na região reguladora 5'de um cassete de expressão alvo da invenção, outros elementos peculiares ao cassete de expressão alvo podem ser também incorporados. Tais elementos incluem, mas sem limitação, um promotor mínimo. Por promotor mínimo deve ser entendido que os elementos basais do promotor são inativos ou quase assim sem ativação a montante. Tal promotor tem baixa atividade residual em plantas quando não há transativador presente ou quando o intensificador ou sítios de ligação de elementos de resposta estão ausentes. Um promotor mínimo que é particularmente útil para genes alvo em plantas é o promotor mínimo Bz1, que é obtido do gene bronze1 de milho. O promotor de núcleo Bz1 é obtido da construção de mutante Bz1 "myc"-luciferase pBz1LucR98 via clivagem no sítio NheI localizado em -53 a -58. Roth et al., Plant Cell 3: 317 (1991). O fragmento de promotor

de núcleo Bz1 derivado se estende assim de -53 a +227 e inclui o Bz1 intron-1 na região não traduzida 5'. Também útil na presente invenção é um promotor mínimo criado pelo uso de um elemento TATA sintético. O elemento TATA sintético possibilita o reconhecimento do promotor por fatores de RNA polimerase e rende um nível basal de expressão de gene na ausência de ativação (vide genericamente, Mukumoto (1993) Plant Mol Biol 23: 995-1003; Green (2000) Trends Biochem Sci 25: 59-63).

4. Marcar Produto Gênico Dentro Da Célula

É conhecida a existência de vários mecanismos para marcar os produtos gênicos, e as seqüências que controlam o funcionamento destes mecanismos têm sido caracterizadas em algum detalhe. Por exemplo, marcar produtos gênicos para o cloroplasto é controlado por uma seqüência de sinais encontrada na extremidade do amino-terminal de várias proteínas, a qual é clivada durante a importação de cloroplastos para produzir a proteína madura (por exemplo, Comai et al., J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988)). Essas seqüências de sinais podem ser fundidas aos produtos gênicos heterólogos para efetuar a importação de produtos heterólogos no cloroplasto (van den Broeck, et al. Nature 313: 358-363 (1985)). DNA que codifica seqüências de sinais apropriadas pode ser isolado da extremidade 5' dos cDNAs que codificam a proteína RUBISCO, a proteína CAB, a enzima EPSP sintase, a proteína GS2 e muitas outras proteínas que são conhecidas por estarem localizadas em cloroplasto. Vide também, a seção intitulada "Expression With Chloroplast Targeting", no Exemplo 37, da Patente US5.639.949.

Outros produtos gênicos estão localizados em outras organelas tais como a mitocôndria e a peroxissoma (por exemplo, Unger et al. Plant Molec. Biol. 13: 41-418 (1989)). Os cDNAs que codificam esses produtos podem ser também manipulados para efetuar a marcação de produtos gênicos heterólogos para essas organelas. Exemplos de tais seqüências são a ATPases codificadas nucleares e isoformas de aspartato amino transferase específicas para mitocôndria. Marcação de corpos de proteínas celulares foi descrita por Rogers et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 82: 6512-6516

(1985)).

Além disso, foram caracterizadas seqüências que causam a marcação de produtos gênicos para outros compartimentos das células. Seqüências amino-terminal são responsáveis por marcar o ER, o apoplasto, e secreção extracelular de células aleurona (Koehler & Ho, *Plant Cell* 2: 769-783 (1990)). Adicionalmente, seqüências amino-terminal em conjunto com seqüências carbóxi-terminal são responsáveis por marcação vacuolar de produtos gênicos (Shinshi et al., *Plant Molec. Biol.* 14: 357-368 (1990)).

Através da fusão das seqüências de marcação apropriadas descritas acima para seqüências de transgenes de interesse, é possível direcionar o produto de transgene para qualquer organela ou compartimento da célula. Para marcar cloroplastos, por exemplo, a seqüência de sinais de cloroplasto de o gene RUBISCO, o gene CAB, o gene de EPSP sintase ou o gene GS2 é fundida, em estrutura, ao amino terminal ATG do transgene. A seqüência de sinais selecionada deve incluir o sítio de clivagem conhecido, e a fusão construída deve levar em conta quaisquer aminoácidos depois do sítio de clivagem, que são requeridos para clivagem. Em alguns casos, essa exigência pode ser satisfeita pela adição de um pequeno número de aminoácidos entre o sítio de clivagem e o ATG do transgene ou, alternativamente, substituição de alguns aminoácidos dentro da seqüência de transgenes. Fusões construídas para importação de cloroplastos podem ser testadas com respeito à eficácia de captação de cloroplastos por tradução in vitro de construções transcritas in vitro, seguida por captação de cloroplastos in vitro usando técnicas descritas por Bartlett et al., Edelman et al. (Eds.) *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Elsevier pp. 1081-1091 (1982) e Wasmann et al. *Mol. Gen. Genet.* 205: 466-453 (1986). Essas técnicas de construção são bem conhecidas da arte e são igualmente aplicáveis às mitocôndrias e peroxissomas.

Os mecanismos descritos acima para marcação celular podem ser utilizados não somente em conjunto com seus promotores cognatos, mas também em conjunto com promotores heterólogos de modo a efetuar uma meta de marcação de células específicas sob a regulação transcricional

de um promotor que tem padrão de expressão diferente daquele do promotor do qual o sinal de marcação deriva.

C. Construção de Vetores de Transformação de Plantas

5 Numerosos vetores de transformação disponíveis para transformação de plantas são conhecidos daqueles com conhecimento ordinário das técnicas de transformação de plantas, e os genes pertinentes a esta invenção podem ser usados em conjuntos com tais vetores. A seleção de vetor dependerá da técnica de transformação preferida e as espécies alvo para a transformação. Para certas espécies alvo, diferentes marcadores de seleção
10 de antibióticos e herbicidas podem ser preferidos. Marcadores de seleção usados rotineiramente na transformação incluem o gene *nplI*, que confere resistência à canamicina e antibióticos relacionados (Messing & Vierra. Gen 19: 259-268 (1982); Bevan et al., Nature 304: 184-187 (1983)), o gene *bar*, que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (White et al., Nucl. Acids
15 Res 18: 1062 (1990), Spencer et al. Theor. Appl. Genet 79: 625-631 (1990)), gene *hph*, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4: 2929-2931), e o gene *dhfr*, que confere resistência ao metatrexato (Bourouis et al., EMBO J. 2(7): 1099-1104 (1983)), o gene EPSPS, que confere resistência ao glifosato (Patente US4.940.935 e
20 Patente US5.188.642), e o gene da manose-6-fosfato isomerase, que proporciona a capacidade de metabolizar manose (Patente US5.767.378 e Patente US5.994.629).

1. Vetores Adequados para Transformação de Agrobactéria

25 Muitos vetores estão disponíveis para transformação usando *Agrobacterium tumefaciens*. Esses tipicamente portam pelo menos uma sequência da borda de T-DNA e incluem vetores tais como pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)). Abaixo, é descrita a construção de dois vetores típicos adequados para transformação de Agrobactéria.

a. pCIB200 e pCIB2001:

30 Os vetores binários pCIB200 e pCIB2001 são usados para a construção de vetores recombinantes para uso com Agrobactéria e são construídos do seguinte modo. pTJS75kan foi criado por digestão de NarI de

pTJS75 (Schmidhauser & Helinski, J. Bacteriol. 164: 446-455 (1985)) permitindo a excisão do gene de resistência à tetraciclina, seguida pela inserção de um fragmento *AccI* de pUC4K compreendendo *NPTII* (Messing & Vierra, Gene 19: 259-268 (1982); Bevan et al., Nature 304: 184-187 (1983); McBride et al., Plant Molecular Biology 14: 266-276 (1990)). Ligantes *XhoI* são ligados ao fragmento *EcoRV* de PCIB7 que contém as bordas de T-DNA da esquerda e da direita, um gene quimérico *nos/nptII* selecionável de planta e o poli-ligante pUC (Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987)) e o fragmento digerido com *XhoI* são clonados em pTJS75kan digerido com *SfiI* para criar pCIB200 (vide também EP 0 332 104, Exemplo 19). pCIB200 contém os seguintes e únicos sítios de restrição de poli-ligante: *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BglII*, *XbaI*, e *Sall*. pCIB2001 é um derivado de pCIB200 criado por inserção no poli-ligante de sítios de restrição adicionais. Sítios de restrição únicos no poli-ligante de pCIB2001 são *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BglII*, *XbaI*, *Sall*, *MluI*, *BclI*, *AvrII*, *Apal*, e *StuI*. PCIB2001, além de conter esses sítios de restrição únicos, contém também seleção de planta e canamicina bacteriana, bordas de T-DNA da esquerda e da direita para transformação mediada por *Agrobactéria*, a função *trfA* derivada de RK2 para mobilização entre *E. coli* e outros hospedeiros, e as funções *OriT* e *OriV* também de RK2. O poli-ligante pCIB2001 é adequado para a clonagem de cassetes de expressão de planta contendo seus próprios sinais reguladores.

b. pCIB10 e Seus Derivados de Seleção de Higromicina

O vetor binário pCIB10 contém um gene que codifica resistência à canamicina para seleção em plantas de seqüências da borda direita e esquerda de T-DNA e incorpora seqüências do plasmídio pRK252 de ampla faixa hospedeira permitindo que ele replique tanto na *E.coli* como na *Agrobactéria*. Sua construção é descrita por Rothstein et al. (Gene 53: 153-161 (1987)). Vários derivados de pCIB10 são construídos que incorporam o gene para higromicina B fosfotransferase descritos por Gritz et al. (Gene 25: 179-188 (1983)). Esses derivados permitem a seleção de células de plantas transgênicas somente em higromicina (pCIB743), ou higromicina e caramicina (pCIB715, pCIB717).

2. Vetores Adequados para Transformação de Não-Agrobactéria

Transformação sem o uso de *Agrobacterium tumefaciens* evita a exigência por seqüências de T-DNA no vetor de transformação escolhido e, conseqüentemente, vetores que carecem destas seqüências podem ser utilizados além dos vetores tais como os descritos acima, que contêm seqüências de T-DNA. Técnicas de transformação que não se baseiam em Agrobactéria incluem transformação via bombardeio de partículas, captação de protoplastos (por exemplo, PEG e eletroporação) e microinjeção. A escolha do vetor depende largamente da seleção preferida para as espécies que estão sendo transformadas. Abaixo, é descrita a construção de vetores típicos adequados para transformação de não-agrobactéria.

a. pCIB3064

pCIB3064 é um vetor derivado de pUC adequado para técnicas de transferências de genes direta em combinação com seleção pelo herbicida basta (ou fosfinotricina). O plasmídeo pCIB246 compreende o promotor CaMV 35S em fusão operacional ao gene GUS da *E. coli* e o terminador transcricional CaMV 35S e está descrito no Pedido PCT WO 93/07278. O promotor 35S desse vetor contém duas seqüências 5'de ATG do sítio de início. Esses sítios são mutados usando técnicas de PCR padrão de modo a remover os ATGs e gerar os sítios de restrição Sspl e PvuII. Os novos sítios de restrição são de 96 e 37 pb de distância do sítio SII único e 101 e 42 bp de distância do sítio de início real. O derivado resultante de pCIB246 é designado pCIB3025. O gene GUS é então excisado do pCIB3025 por digestão com Sall e SacI, o terminais tornados cegos e religados para gerar o plasmídeo pCIB3060. O plasmídeo JIT82 é obtido do John Innes Centre, Noruega e o fragmento SmaI de 400 bp contendo o gene bar de *Streptomyces viridochromogenes* é excisado e inserido no sítio HpaI de pCIB3060 (Thompson et al., EMBO J 6: 2519-2523 (1987)). Isso gerou pCIB3064, que compreende o gene bar sob o controle do promotor CaMV 35S e o terminador para seleção de herbicida, um gene para resistência à ampicilina (para seleção em *E. coli*) e um poli-ligante com os sítios únicos SphI, PstI, HindIII, e BamHI. Esse vetor é adequado para a clonagem de cassetes de expressão de planta con-

tendo seus próprios sinais reguladores.

b. pSOG19 e pSOG35:

pSOG35 é um vetor de transformação que utiliza o gene diidroftalase redutase (DFR) da *E. coli* como um marcador selecionável que confere resistência ao metotrexato. PCR é usado para amplificar o promotor 35S (-800 bp), intron 6 do gene Adh1 do milho (-550 bp) e 18 bp da sequência líder não traduzida de GUS de pSOg10. Um fragmento de 250 bp que codifica o gene tipo II de diidroftalato redutase de *E. coli* é também amplificado por PCR e estes dois fragmentos de PCR são montados com um fragmentos de SacI-PstI de pB1221 (Clontech) que compreende a estrutura principal do vetor pUC19 e o terminador de nopalina sintase. A montagem desses fragmentos gera pSOG19 que contém o promotor 35S em fusão com a sequência de intron 6, o líder GUS, o gene DHFR e o terminador de nopalina sintase. Substituição do líder GUS no pSOG19 com a sequência líder do Vírus do Mosqueado Clorótico de Milho (MCMV) gera o vetor pSOG35. pSOG19 e pSOG35 transportam o gene pUC para resistência à ampicilina e têm sítios HindIII, SphI, PstI e EcoRI disponíveis para a clonagem de substâncias estranhas.

3. Vetor Adequado para Transformação de Cloroplasto

Para expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção em plastídios de plantas, o vetor de transformação de plastídio pPH143 (WO 97/32011, Exemplo 36) é usado. A sequência de nucleotídeos é inserida no pPH143 repondo a sequência de codificação de PROTOX. Esse vetor é então usado para transformação de plastídio e seleção de transformantes para resistência à espectinomicina. Alternativamente, a sequência de nucleotídeos é inserida no pPH143 de modo que ela repõe o gene aadH. Nesse caso, os transformantes são selecionados para resistência aos inibidores PROTOX.

D. Transformação

Uma vez que a sequência de ácidos nucléicos da invenção foi clonada em um sistema de expressão, ela é transformada em uma célula de plantas. O receptor e cassete de expressão alvo da presente invenção po-

dem ser introduzidos na célula da planta de vários modos conhecidos da técnica. Métodos para regeneração de plantas são também bem conhecidos da técnica. Por exemplo, vetores de plasmídeo Ti têm sido utilizados para a distribuição de DNA estranho, bem como captação direta de DNA, lipossomas, eletroporação, microinjeção, e microprojéteis. Além disso, bactérias do gênero *Agrobactéria* podem ser utilizadas para transformar células de plantas. Abaixo, estão descrições de técnicas representativas para transformar tanto as plantas dicotiledôneas como as monocotiledôneas, bem como uma técnica de transformação de plastídio representativo.

10 1. Transformação de Dicotiledôneas

As técnicas de transformação para dicotiledôneas são bem conhecidas da técnica e incluem técnicas com base em *Agrobactéria* e técnicas que não requerem *Agrobactéria*. Técnicas de Não-*Agrobactéria* que envolvem a captação de material genético exógeno diretamente por protoplastos ou células. Isso pode ser obtido por PEG ou captação mediada por eletroporação, distribuição mediada por bombardeio de partículas, ou microinjeção. Exemplos dessas técnicas são descritas por Paszkowski et al., EMBO J 3: 2717-2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199: 169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986), e Klein et al., Nature 20 327: 70-73 (1987). Em cada caso, as células transformadas são regeneradas para as plantas inteiras usando técnicas padrão conhecidas da técnica.

Transformação mediada por *Agrobactéria* é uma técnica preferida para transformação de dicotiledôneas devido a sua alta eficácia de transformação e usa ampla utilidade com muitas espécies diferentes. Transformação de *Agrobactéria* envolve tipicamente a transferência do vetor binário transportando o DNA estranho de interesse (por exemplo, pCIB200 ou pCIB2001) para uma linhagem de *Agrobactéria* apropriada que pode depender do complemento de genes vir pela linhagem *Agrobactéria* hospedeira, tanto em um plasmídeo Ti co-residente ou cromossomicamente (por exemplo, linhagem CIB542 para pCIB200 e pCIB2001 (Uknes et al. Plant Cell 5: 159-169) (1993)). A transferência do vetor binário recombinante para *Agrobactéria* é obtida por um procedimento de conjugação triparental usando *E.*

coli transportando o vetor binário recombinante, uma linhagem de *E. coli* helper que transporta o vetor binário recombinante, que transporta um plasmídeo tal como pRK2013 e o qual é capaz de mobilizar o vetor binário recombinante para a linhagem de Agrobactéria alvo. Alternativamente, o vetor binário recombinante pode ser transferido para a Agrobactéria por transformação de DNA (Hofgen & Willmitzer, Nucl. Acids. Res. 16: 9877 (1988)).

A transformação das espécies de plantas alvo por Agrobactéria recombinante envolve usualmente co-cultura da Agrobactéria com explantes da planta e segue os protocolos bem conhecidos da técnica. O tecido transformado é regenerado em meio selecionável compreendendo o marcador de resistência a antibiótico ou herbicida presente entre as bordas do T-DNA do plasmídeo binário.

Uma outra abordagem para transformar células de plantas com um gene envolve propelir partículas inertes ou biologicamente ativas em tecidos ou células de plantas. Essa técnica é descrita nas Patentes US 4.945.050, US 5.036.006, e US 5.100.792, todas de Stanford et al. Geralmente, esse procedimento envolve propelir partículas inertes ou biologicamente ativas nas células sob condições eficazes para penetrar a superfície externa da célula e poder proporcionar incorporação dentro do interior desta. Quando partículas inertes são utilizadas, o vetor pode ser introduzido nas células por revestimento das partículas com o vetor que contém o gene desejado. Alternativamente, a célula alvo pode ser circundada pelo vetor de modo que o vetor é transportado para a célula pelo estímulo da partícula. Partículas biologicamente ativas (por exemplo, células de leveduras secas, bactérias secas ou um bacteriófago, cada um contendo DNA destinado a ser introduzido) podem ser também propelidas no tecido de célula da planta.

2. Transformação de Monocotiledôneas

A transformação da maioria das espécies de monocotiledôneas tem também se tornado rotina. Técnicas preferidas incluem transferência direta de gene em protoplastos usando PEG ou técnicas de eletroporação, e bombardeio de partículas em tecido de calos. As transformações podem ser efetuadas com uma espécie de DNA simples ou espécies de DNA múltiplos

(isto é, co-transformação) e ambas as técnicas são adequadas para uso com esta invenção. A co-transformação pode ter a vantagem de evitar a completa construção de vetor e de gerar plantas transgênicas com locais não ligados para o gene de interesse e o marcador selecionável, permitindo a remoção do marcador selecionável em gerações subseqüentes, caso isso seja considerado desejável. Contudo, uma desvantagem do uso de co-transformação é a frequência menor que 100% com a qual as espécies de DNA separadas são integradas no genoma (Schocher et al., *Biotechnology* 4: 1093-1096 (1986)).

Os Pedidos de Patente EP 0 292 435, EP 0 392 225 e WO 93/07278 descrevem técnicas para a preparação de calo e protoplastos de uma linhagem endógama de elite de milho, transformação de protoplastos usando PEG ou eletroporação, e a regeneração de plantas de milho de protoplastos transformados. Gordon-Kamm et al. (*Plant Cell* 2: 603-618 (1990)) e Fromm et al. (*Biotechnology* 8: 833-839 (1990)) publicaram técnicas para transformação de linhagem de milho derivada de A188 usando bombardeio de partículas. Além disso, WO 93/07278 e Kozile et al. (*Biotechnology* 11: 194-200 (1993)) descrevem técnicas para a transformação de linhagens endógamas de elite de milho por bombardeio de partículas. Essa técnica utiliza embriões imaturos de milho de comprimento de 1,5-2,5 mm excisados de uma orelha de milho de 14 a 15 depois da polinização e um Dispositivo Biolístico PDS 1000He para bombardeio.

Transformação de arroz pode ser efetuada por técnicas de transferência direta de gene utilizando protoplastos ou bombardeio de partículas. Transformação mediada por protoplastos foi descrita para tipos Japônica e tipos Índica (Zahng et al. *Plant Cell Rep* 7: 379-384 (1988); Shimanoto et al. *Nature* 338: 274-277 (1989); Datta et al. *Biotechnology* 8: 736-740 (1990)). Ambos os tipos são também rotineiramente transformáveis usando bombardeio de partículas (Christou et al. *Biotechnology* 9: 957-962 (1991)). Além disso, WO 93/21335 descreve técnicas para a transformação de arroz via eletroporação.

O Pedido de Patente EP 0 332 581 descreve técnicas para a

geração, transformação e regeneração de protoplastos de Poaceae. Essas técnicas possibilitam a transformação de *Dactylis* e trigo. Além disso, a transformação de trigo foi descrita por Vasil et al. (Biotechnology 10: 667-674 (1992)) usando bombardeio de partículas nas células de calos regeneráveis de longo prazo tipo C, e também por Vasil et al. (Biotechnology 11: 1553-1558 (1993)) e Weeks et al. (Plant Physiol. 102: 1077-1084 (1993)) usando bombardeio de partículas de embriões imaturos e calos derivados de embriões imaturos. Contudo, uma técnica preferida para transformação de trigo envolve a transformação de trigo por bombardeio de partículas de embriões imaturos e inclui tanto uma etapa de com alta sacarose ou com alta maltose antes da distribuição de genes. Antes do bombardeio, qualquer número de embriões (0,75-1 mm de comprimento) é revestido em um meio MS com 3% de sacarose (Murashiga & Skoog, Physiologia Plantarum 15: 473-497 (1962)) e 3 mg/L de 2,4-D para indução de embriões somáticos, o qual pode prosseguir no escuro. No dia escolhido para o bombardeio, os embriões são removidos do meio de indução e colocados sobre o osmótico (isto é, meio de indução com sacarose ou maltose adicionada na concentração desejada, tipicamente 15%). Os embriões são deixados plasmolisar por 2 a 3 horas e são então bombardeados. Vinte embriões por placa alvo é típico, embora não crítico. Um plasmídeo transportando gene apropriado (tal como pCIB3064 ou pSG35) é precipitado sobre partículas de ouro de tamanho micrométrico, usando procedimento padrão. Cada placa de embriões é submetida a disparo com o dispositivo com hélio DuPont Biolistics.RTM., usando uma pressão explosiva de cerca de 6.895 MPa (1.000 psi) e usando uma peneira padrão de 80 mesh. Depois do bombardeio, os embriões são colocados de volta no escuro para recuperação por cerca de 24 horas (ainda no osmótico). Depois de 24 horas, os embriões são removidos do osmótico e colocados de volta no meio de indução onde eles ficam por cerca de um mês antes da regeneração. Aproximadamente um mês mais tarde, os explantes de embriões com calos embriogênicos em desenvolvimento são transferidos para o meio de regeneração (MS+1 mg/L de NAA, 5 mg/L de GA), contendo ainda o agente de seleção apropriado (100 mg/l de basta no caso de

pCIB3064 e 2 mg/L de metotrexato no caso de pSOG35). Depois de aproximadamente um mês, os brotos desenvolvidos são transferidos para recipientes conhecidos como "GA7s", que contêm MS semi-resistente, 2% de sacarose, e a mesma concentração de agente de seleção.

- 5 A transformação de monocotiledôneas usando *Agrobactéria* foi também descrita. Vide, WO 94/00977 e a Patente US5.591.616, ambos são aqui incorporados a título de referência. Vide também Negrotto et al., *Plant Cell Reports* 19: 798-803 (2000), aqui incorporada a título de referência.

- 10 Por exemplo, arroz (*Oryza sativa*) pode ser usado para gerar plantas transgênicas. Várias cultivares de arroz podem ser usadas (Hiei et al., 1994, *Plant Journal* 6:271-282); Dong et al., 1996, *Molecular Breeding* 2:267-276; Hiei et al., 1997, *Plant Molecular Biology*, 35:205-218). Também, os vários constituintes dos meios descritos abaixo podem ter as quantidades variadas ou serem substituídos. Respostas embriogênicas são iniciadas e/ou
- 15 as culturas são estabelecidas a partir de embriões maduros por cultivo no meio MS-CIM (Sais basais do MS, 4,3 g/L; vitaminas B5 (200 vezes), 5ml/L; Sacarose, 30 g/L; prolina, 500 mg/L; glutamina, 500 mg/L; hidrolisado de caseína, 300 mg/L; 2,4-D (1 mg/ml), 2ml/L; ajustar o pH para 5,8 com KOH 1N; Phytigel, 3 g/L). Tantos os embriões maduros nos estágios iniciais de
- 20 resposta à cultura como as linhagens de culturas estabelecidas são inoculados e co-cultivados com a linhagem *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (*Agrobactéria*) contendo a construção de vetor desejada. A *Agrobactéria* é cultivada de estoques de glicerol em meio de YPC sólido (100 mg/L de espectinomicina e qualquer outro antibiótico apropriado) por cerca de 2 dias a
- 25 28°C. A *Agrobactéria* é re-suspensa em meio MS-CIM líquido. A cultura de *Agrobactéria* é diluída para uma OD600 de 0,2 a 0,3 e acetosiringona é adicionada para uma concentração final de 200 µM. Acetosiringona é adicionada antes de misturar a solução com as culturas de arroz para induzir a *Agrobactéria* para transferência de DNA para as células da planta. Para inoculação,
- 30 as culturas de planta são imersas na suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana líquida é removida e as culturas inoculadas são colocadas no meio de co-cultivo e incubadas a 22°C, por dois dias. As culturas são então

transferidas para o meio MS-CIM com Ticarcilina (400 mg/L) para inibir o crescimento da Agrobactéria. Para construções utilizando o gene de marcador selecionável PMI (Reed et al., In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:127-132), as culturas são transferidas para o meio de seleção contendo Manose como

5 fonte de carboidrato (MS com 2% de Manose, 300 mg/L de Ticarcilina) depois de 7 dias, e cultivadas por 3 a 4 semanas, no escuro. Colônias resistentes são então transferidas para o meio de indução de regeneração (MS sem 2,5-D, 0,5 mg/L de IAA, 1 mg/L de zeatina, 200 mg/L de timentina, 2% de manose e 3% de Sorbitol) e crescidas no escuro por 14 dias. Colônias em

10 proliferação são então transferidas para um outro ciclo de meio de indução de regeneração e movidas para a sala de crescimento, clara. Brotos regenerados são transferidos para recipientes GA7 com médio GA7-1 (MS sem hormônios e 2% de Sorbitol) por 2 semanas e então movidos para a estufa quando eles estão grandes o bastante e têm raízes adequadas. As plantas

15 são transplantadas para o solo na estufa (Para geração) e crescidas para maturidade e a semente T1 é colhida.

3. Transformações de Plastídios

Sementes de *Nicotiana tabacum* c.v. "Xanthienc" são germinadas, sete por placa, em uma disposição circular de 2,54 cm (1 polegada) no

20 meio de ágar T e bombardeadas durante 12 a 14 dias após implantas com partículas de tungstênio de 1 μm (M10, Biorad, Hercules, CA) revestidas com DNA dos plasmídios pPH143 e pPH145, essencialmente conforme descrição (Svab, Z. e Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913-917). As sementeiras bombardeadas são incubadas em meio T por dois dias, depois do que as

25 folhas são cortadas e colocadas com o lado abaxial para cima em luz brilhante (350-500 μmol s de fótons/ m^2/s) em placas de meio RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. e Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526-8530) contendo 500. $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dicloridrato de espectinomicina (Sigma, St. Louis, Mo). Brotos resistentes surgindo embaixo das folhas alvejadas, três a oito semanas após o

30 bombardeio, são subclonados no mesmo meio seletivo, deixados formarem calos, e os brotos secundários isolados e subclonados. Segregação completa das cópias do genoma de plastídios transformados (homoplasmicidade)

em subclones independentes é avaliada por técnicas padrão de Southern blotting (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). DNA total digerido com BamHI/EcoRI (Mettler, I.J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346349) é separado em 1% de Tris-borato (TBE)-géis de agarose, transferido para membranas de náilon (Amersham) e sondados com seqüências de DNA sensibilizada aleatoriamente e marcadas com ^{32}P correspondendo a 0,7 kb de fragmento de DNA BamHI/HindIII de pC8 contendo uma porção da seqüência de marcação de plastídios rps {fração (7/12)}. Brotos homoplásmicos são enraizados assepticamente em meio de MS/IBA contendo espectomicina (McBride, K.E. et al., (1994) PNAS 91, 7301-7305) e transferidos para a estufa.

V. Cruzamento e Produção de Sementes

A. Cruzamento

As plantas obtidas via transformação com uma seqüência de ácidos nucleicos da presente invenção podem ser qualquer uma de uma ampla variedade de espécies de plantas, incluindo aquelas de monocotiledôneas e dicotiledôneas; contudo, as plantas usadas no método da invenção são preferivelmente selecionadas da lista de colheitas alvos agronomicamente importantes, estabelecidas acima. A expressão de um gene da presente invenção em combinação com outras características importantes para a produção e qualidade pode ser incorporada em linhagens de plantas através de cruzamento. Abordagens e técnicas de cruzamento são conhecidas da técnica. Vide, por exemplo, Welsh J.R., Fundamentals of Plant Genetics and Breeding, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1981); Crop Breeding, Wood D.R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1993); Mayo O., The Theory of Plant Breeding, 2ª Edição, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D.P., Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests, Springer-Verlag, Nova Iorque (1986); e Wricke e Weber, Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding, Walter de Gruyter and Co., Berlim (1986).

As propriedades genéticas engenheiradas nas sementes e plantas descritas acima são transmitidas por reprodução sexual ou crescimento vegetativo e podem ser assim mantidas e propagadas nas plantas progê-

nies. Geralmente, a dita manutenção e propagação fazem uso de métodos agrícolas conhecidos desenvolvidas para adaptação de propósitos específicos tais como lavrar, semear ou colher. Processos especializados, tais como tecnologias de hidropônicos ou de estufa, podem ser aplicados. Como a colheita em crescimento é vulnerável ao ataque e danos provocados por insetos ou infecções, bem como à competição de ervas daninhas, medidas são tomadas para controlar as ervas daninhas, doenças de plantas, insetos, nematódeos, e outras condições adversas para melhorar o rendimento. Essas incluem medições mecânicas tais como lavragem do solo ou remoção das ervas daninhas e plantas infectadas, bem como a aplicação de defensivos agrícolas, tais como herbicidas, fungicidas, gametocidas, nematicidas, reguladores de crescimento, agentes de amadurecimento e inseticidas.

O uso das propriedades genéticas vantajosas das plantas transgênicas e sementes, de acordo com a invenção, pode ser feito ainda no cruzamento da planta, que almeja o desenvolvimento de plantas com propriedades aperfeiçoadas tais como tolerância a pestes, herbicidas ou estresse, valor nutricional aperfeiçoado, rendimento aumentado, ou estrutura aperfeiçoada causando menor perda de instalação ou por destruição. As várias etapas de cruzamento são caracterizadas por intervenção humana bem definida tal como seleção das linhagens a serem cruzadas, direcionamento da polinização das linhagens parentais, ou seleção de plantas progênie apropriadas. Dependendo das propriedades desejadas, medições de cruzamentos diferentes são tomadas. As técnicas relevantes são bem conhecidas na arte e incluem, mas sem limitação, hibridização, endogamia, cruzamento com linhagens múltiplas, combinação de variedades, hibridização interespecífica, técnicas aneuplóides, etc. Técnicas de hibridização incluem também a esterilização das plantas para render plantas machos ou fêmeas por meios mecânicos, químicos, ou bioquímicos. A polinização cruzada de uma planta estéril macha com pólen de uma linhagem diferente assegura que o genoma da planta macho estéril, mas fêmea fértil obterá uniformemente propriedades de ambas as linhagens parentais. Assim, as sementes transgênicas e plantas de acordo com a invenção podem ser usadas para o cruzamento de li-

nhagens de plantas aperfeiçoadas, que, por exemplo, aumentam a eficácia dos métodos convencionais tal como tratamento com herbicida ou com pesticida ou permitem que se dispense com os ditos métodos devido às suas propriedades genéticas modificadas. Alternativamente, novas colheitas com
5 aperfeiçoada tolerância ao estresse podem ser obtidas, que, devido ao seu "equipamento" genético otimizado, rendem um produto colhido de melhor qualidade que os produtos que não foram capazes de tolerar condições de desenvolvimento adversas, comparáveis.

B. Produção de Sementes

10 Na produção de sementes, a qualidade da germinação e a uniformidade das sementes são características essenciais do produto. Como é difícil manter uma colheita livre de outra colheita e de sementes de ervas daninhas, para controlar doenças contidas nas sementes, e para produzir
15 sementes com boa germinação, práticas de produção de sementes razoavelmente extensivas e bem definidas têm sido desenvolvidas por produtores de sementes, que são experientes na técnica de crescimento, acondicionamento e comercialização de semente pura. Assim, é prática comum para o fazendeiro comprar semente certificada que satisfaz os padrões específicos de qualidade em vez de usar semente colhida de sua própria colheita. Mate-
20 rial de propagação a ser usado como sementes é usualmente tratada com um revestimento protetor que compreende herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematicidas, moluscicidas, ou misturas destes. Costumeiramente, os revestimentos protetores usados compreendem compostos tais como captano, carboxin, thiram (TMTD.TRM), metalaxil (Apron.RTM), e piri-
25 mifos-metil (Actellic.RTM.). Se desejado, esses compostos são formulados juntamente com mais veículos, tensoativos ou adjuvantes promotores de aplicação costumeiramente empregados nas técnicas de formulação para proporcionar proteção contra danos causados por pragas bacterianas, fúngicas ou animais. Os revestimentos protetores podem ser aplicados por im-
30 pregnação do material de propagação com uma formulação líquida ou por revestimento com uma formulação molhada ou secada, combinadas. Outros métodos de aplicação são também possíveis tal como tratamento direciona-

do nos brotos ou na fruta.

Os seguintes exemplos são dados a título de ilustração e explanação, e não têm como objetivo limitar a invenção, em qualquer modo.

EXEMPLOS

5 Exemplo 1

Transformação de Agrobactéria do Milho – Embriões Imaturos

Preparação da Orelha

Colher orelhas quando os embriões imaturos nos grãos centrais são de aproximadamente 0,5 a 1,0 mm.

- 10 Debulhar e esterilizar as orelhas em uma solução de 20% de Clorox e 3 gotas de Tween/litro de solução. Colocar em um agitador orbital por 20 minutos.

Enxaguar as orelhas, três vezes, com ddH₂O estéril.

- 15 Em um ambiente estéril, cortar os topos dos grãos. Colocar a orelha em uma placa de Petri e isolar os embriões imaturos.

Preparar a solução de inoculação para transformação

- A 100ml de meio de LP-Lsinf., adicionar 50 µL de solução de estoque de acetosiringona (AS) (40 mg/ml de estoque/ml) para uma concentração final de 100 µM de AS.
- 20 • Pipetar 4ml (2,5) do meio de infecção em 10ml de tubo descartável.
- Preparar tubos Eppendorf para coletar os embriões nesse momento e adicionar ~1,4ml do meio de infecção com AS a eles.

Preparação de suspensão de Agrobactéria

- 25 • Tomar uma alça Agrobactéria e re-suspendê-la por turbilhamento em um tubo descartável de 10ml com 4ml (2,5ml) de meio de infecção.
- Medir a densidade óptica da suspensão de Agrobactéria. Ajustar a OD₆₆₀ para aproximadamente 0,45 a 0,55.

30 Isolamento de Embriões Imaturos e Transformação

- Excisar os embriões e colocá-los no topo do meio de infecção em um tubo Eppendorf.

Excisar os embriões por 30 a 35 minutos para obter um total de ~150 embriões.

- Turbilhonar os embriões (agitar manualmente) por 5 segundos.
- Impingir termo-choque aos embriões em banho de água a 45°C, por 5 minutos. Não deixar que a tampa do tubo Eppendorf entre em contato com a água (possíveis problemas de contaminação).

5 • usar uma pipeta descartável para remover o meio de infecção e substituir com 1,5 de suspensão de Agrobactéria. Turbilhonar por 30 segundos.

- 10 • Deixe que o tubo assente por 5 minutos.
- Agitar o tubo para suspender os embriões e verter em uma placa de Petri com meio AS 500 modificado com LS.

• Pipetar a suspensão de Agrobactéria e transferir os embriões para uma área da placa que não tenha sido exposta à Agrobactéria.

15 Ter certeza absoluta que todos os embriões estão com o lado do escutelo para cima.

Co-cultivo

- Co-cultivar embriões e a Agrobactéria, a 23°C, por 2 a 3 dias.

Indução de calos nos embriões/somática

- 20 • Transferir o tecido (18 embriões/placa) para o meio de pré-seleção/indução de calos por 10 a 14 dias a 28°C, no escuro.

Seleção da Manose

- Transferir grupos de calos no Meio de Seleção. 9 grupos por placa. Cultivar por aproximadamente 2 semanas a 28°C, no escuro.
- 25 • Checar as culturas quanto à contaminação e resposta de calos e cultivar por mais 2 semanas a 28°C, no escuro.

Transferir 4 eventos por placa de tecido de crescimento para o meio de regeneração de MS (R1) e deixar no escuro por 10 a 14 dias.

30 Transferir tecido em crescimento/plantas de 4 eventos por placas para a luz, por 14 dias, no claro.

Transferir os eventos para meios de formação de raízes em recipientes de cultura de tecido (2 eventos/ recipiente Greiner).

Milho transgênico foi crescido na estufa para o estágio T0 ou T1, e amostras de sabugo ou de outros materiais foram selecionadas dos eventos transgênicos produzidos. Os plasmídios mostrados na Figura 1 e Figura 2 mostram os plasmídios (pSyn12210 contendo a construção CAD RNAi, e pSyn12345 contendo a construção COMT RNAi) usados no protocolo de transformação de milho dado acima.

Exemplo 2

Seleção de evento T1 CAD pSyn12210

As amostras de sabugo T1 de um total de 15 eventos (10 de cópia baixa, 3 média e 2 alta) incluem 65 linhagens (28 linhagens de cópia baixa, 14 de cópia média, 5 de cópia alta e 18 nula para controle) foram enviadas para análise de MSU para NDF (fibra), ADL (lignina), IVNDFD (digestibilidade de NDF *in vitro*). 3 isolinhagens BM3 e 2 checagens de híbridos foram também incluídos. Comparamos a diferença entre as linhagens (transgênicas versus nulas) do mesmo evento, entre os eventos, ou entre os eventos de cópia baixa, média e alta com os controles positivos BM3 ou negativos e checagem de híbridos. Embora alguns destas tenham ficado nas 16 linhagens de topo mencionadas abaixo, nenhuma destas mostrou redução consistente de lignina nos testes futuros. Os dados estão na Tabela 1 e os métodos usados para análise são dados abaixo.

Seleção de evento T1 COMT (PsYN 12345)

Análise do sabugo T1: 41 eventos totais (23 de cópia baixa, 13 de média, e 5 de alta) incluem 131 linhagens (24 linhagens de cópia baixa, 13 de média, 8 de alta e 20 de nulo para controle) foram enviados para MSU para análises (ADL, NDF, IVNDFD), isolinhagens 3BM3, uma de controle JHAX707 e uma para checagem de híbridos foram também incluídas.

Análise de sabugo T1: As 7 linhagens de topo contendo pSyn12210 ou pSyn12345 foram selecionadas com base no teor de lignina e dados de digestibilidade *in vitro*. Essas linhagens mostraram redução do teor de lignina e aperfeiçoada digestibilidade em comparação com o sabugo de controle conforme mostrado na Tabela 1. Os dados referentes aos dois melhores eventos contendo plasmídio pSyn12345 estão apresentados na Tabe-

la 2.

Tabela 1

Características de ensilagem de eventos selecionados contendo nocautes de RNAi ou de COMT. Em 2 resíduos genéticos em comparação com linhagens nulas do mesmo evento. DM = matéria seca, NDF = Fibra Detergente Neutra, ADF = Fibra Detergente Ácida, IVTD = Digestibilidade real *in vitro*, IVNDFD = Desaparecimento de NFD *in vitro*.

Evento	Nocaute de Gene	Cruzamento	Geração	% DM	5 CINZAS	% NDF	% ADF	% Lignina	% IVTD	% IVNDFD
1	Nulo CAD	1	T2	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
				89,4	2,6	67,0	37,1	5,0	59,6	39,9
				89,3	3,1	64,9	35,2	4,3	64,3	45,0
2	Nulo CAD	1	T2	-0,1	0,5	-2,1	-1,9	-0,7	4,7	5,1
				90,5	1,2	76,6	41,9	5,5	53,0	38,7
				89,5	2,7	70,9	39,3	5,1	59,8	43,5
3	Nulo COMT	1	T2	-0,7	1,5	-5,7	-2,6	-0,5	6,7	4,8
				94,0	3,2	77,1	44,7	6,6	49,4	34,4
				94,3	3,1	75,6	43,7	5,8	53,5	38,5
4	Nulo COMT	1	T1	0,3	-0,1	-1,5	-0,9	-0,8	4,1	4,1
				92,4	2,5	77,1	45,2	6,8	48,8	33,6
				90,1	3,4	75,6	43,2	6,0	53,3	38,3
				-2,2	0,9	-1,5	-2,1	-0,8	4,5	4,7

Evento	Nocaute de Gene	Cruzamento	Geração	% DM	5 CINZAS	% NDF	% ADF	% Lignina	% IVTD	% IVNDFD
				MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
4	Nulo COMT	1	T2	88,8	3,4	78,9	45,3	6,6	50,1	36,7
				87,7	3,1	72,7	40,6	5,7	57,0	40,9
				-1,1	-0,2	-6,2	-4,7	-0,9	7,0	4,2
5	Nulo COMT	1	T2	89,0	2,7	78,2	44,8	6,8	51,0	37,4
				88,8	3,4	70,5	39,2	5,6	59,0	42,2
				-0,2	0,7	-7,7	-5,6	-1,2	7,9	4,7
6	Nulo COMT	1	T2	89,8	2,4	82,6	46,7	6,6	43,3	31,4
				89,6	3,1	78,8	43,7	5,8	50,8	37,6
				-0,2	0,6	-3,9	-3,0	-0,8	7,5	6,2
7	Nulo COMT	2	T1	n/a	n/a	n/a	n/a	6,3	n/a	n/a
				n/a	n/a	n/a	n/a	5,6	n/a	n/a
				89,5	3,4	84,7	48,3	6,1	47,7	38,3
	Bmr isogênico									
	Bmr normal			89,5	3,2	80,1	42,4	1,7	73,2	66,6
				0	-0,2	-4,6	-5,9	-4,4	25,5	28,3

Tabela 2

Dados mostrando redução consistente em % de lignina e aumento em % de IVNDFD para 2 eventos de topo

Evento		Lignina (%)		IVNDFD (%)		
		Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2	Expt 3
3	Nulo	6,6	5,6	34,4	35,8	27,1
	COMT	5,8	4,9	38,5	40,0	31,4
6	Nulo	6,6		31,4	33,0	
	COMT	5,8	6,2	37,6	40,3	31,6
Bm3*		1,7		66,6	68,0	53,5
Bm3 iso		6,1		38,3	41,2	34,2

Para metodologias gerais aplicáveis a essas análises, vide:

- 5 Goering, H.K., e P.J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses. Apparatus, Reagents, Procedures, and some applications. Agric. Handbook N° 379. ARS-USDA.

ADF – Fibra Detergente Ácida – (método Van Soest)

- 10 Realizada em capela química, com equipamento apropriado que inclui jaleco resistente a produtos químicos, capa para laboratório, luvas de borracha resistente a produtos químicos, óculos de segurança.

- 15 O método de ADF hidrolisa os componentes da parede celular que inclui pectinas e hemicelulose. A fração remanescente, chamada de ADF contém celulose, lignina e cinzas. Ela é expressa como porcentagem da fração da parede celular total.

O resíduo de ADL é gerado a partir da fração de ADF, e representa lignina + cinzas.

- 20 A etapa inicial é para recuperar a fração da parede celular de um tecido de planta particular. Em outras palavras ela eliminará compostos solúveis, tais como açúcares, proteínas, óleo e fibra solúvel. Se a amostra contém uma grande quantidade de óleo (tal como sementes de soja) então lavagem com acetona é requerida (inicialmente triturar, então usar um tubo de vidro, ou tempo de incubação em tubo de plástico curto). O tecido é secado e triturado em partículas de não mais que 2 mm de tamanho. Tipicamente,

cerca de 2 a 3 g de tecido são adicionados a um tubo cônico de 50ml. Então, 40ml de etanol a 80% são adicionados, e misturados por 5 horas em um agitador giratório. Uma outra lavagem é requerida durante a noite. Então, 40ml de água são adicionados durante uma lavagem de 1 hora, repetindo a lavagem em um total de 3 vezes. Algum tecido será perdido durante as trocas de solução. Uma lavagem preliminar deve ser feita para estimar a quantidade de tecido inicial para produzir cerca de 1 g de amostra de parede celular final.

No caso de tecido de sabugo, devido ao teor de parede celular ser muito alto, não há necessidade de se fazer uma preparação da parede celular. Assim, as análises de ADF e ADL serão calculadas com base no total de matéria seca.

Solução de ADF

2% de CTAB em H_2SO_4 1N

(para 1 litro de estoque, adicionar 20 g de CTAB para 900ml de água deionizada (di), agitar por poucos minutos até redução do tamanho de partícula. Então, adicionar 62,5ml de ácido sulfúrico 16N (Fisher A298-212, 98%, densidade de 1,84 g/ml). Conforme o ácido é adicionado, a mistura de CTAB + água/ácido se torna solubilizada. Preencher para 1 L com água deionizada.

A solução de ADF pode ser também adquirida da ANKOM (www.ankom.com).

Registrar o peso da sacola da ANKOM.

Pesar 250 mg de uma amostra secada a ar (de com/ou sem incubação a 37°C de amostra seca).

Verter no saco de filtro (tipo F57) da ANKOM; registrar o peso.

Vedar com termo-vedador.

Adicionar a um béquer de vidro Pyrex de 2.000ml, tipicamente 20 sacolas (24 max.) com 500ml da solução ADF. Cobrir com placa Pyrex de 1.000ml. Colocar em placa de vidro (Pyrex, diâmetro de 190 mm X 100 mm de altura), preenchida com água em ebulição. Adicionar, também, algumas pedras de PTFE em ebulição à placa. A água deve ser mantida em ebulição

por 1 hora. Agitar os sacos a cada 15 minutos.

Enxaguar no mínimo 4 vezes com H_2O a 85-90°C. Todo o rejeito líquido é descartado em uma pia com água corrente contínua. Mais dois minutos de enxágüe com pequeno volume de acetona, que é então descartada em recipiente com rejeito de solvente.

Secar a 70°C, em forno, durante a noite.

Pesar tecido residual = ADF.

ADL – Lignina Detergente Ácida

Realizada em capela química, com equipamento apropriado que inclui jaleco resistente a produtos químicos, capa para laboratório, luvas de borracha resistente a produtos químicos, óculos de segurança.

Ao resíduo de ADF seco (20-40 sacolas), adicionar 500ml de ácido sulfúrico a 72%, cobrir todas as sacolas.

Usar um béquer de vidro Pyrex de 2.000ml, com 20 sacolas (24 no máximo) e cobrir com uma placa Pyrex de 1.000ml.

NOTA: ácido sulfúrico a 72% pode ser preparado por adição de 750ml de ácido concentrado (95%) em 250ml de água. Cuidado: a mistura é muito quente e requer que o ácido seja vertido lentamente para evitar projeções. A garrafa é ainda colocada em um banho de água à temperatura ambiente (2 enxágües) para resfriamento rápido e uso. Pode-se também adquirir o H_2SO_4 a 72% da Ankom.

Incubar na temperatura ambiente, por 3 horas, agitar várias vezes.

Excesso de ácido é descartado em rejeito de ácido líquido.

Então enxaguar, pelo menos cinco vezes com água quente (85 a 90°C). As lavagens são realizadas na pia.

Enxágüe final em acetona por 2 minutos, descartar o solvente em um contêiner para lixo.

Secar em forno, a 70°C, durante a noite.

Pesar o tecido residual = ADL

Análise de Fibra Detergente Neutra

Preparar as amostras conforme recomendação do protocolo de

trituração padrão, sem usar o Triturador Perten Hammer.

Colocar as amostras na balança seca para avaliar o teor de umidade da mistura.

Numerar as sacolas com marcador resistente a solvente.

5 Registrar o peso das sacolas de amostra seca, vazias, Ankom.

Tomar a amostra seca e pesar 0,5 g da amostra seca em sacolas de filtro Ankom.

Vedar as amostras com termo-vedador.

10 Dissolver 20 g de Sulfito de Sódio (0,5/50ml de solução de NDF) em 2.000ml de solução de NDF.

Ligar o aquecedor até atingir ebulição, uma vez em ebulição adicionar a amostra nas sacolas e cobrir soltamente.

Ajustar o cronômetro para 105 minutos.

15 Depois de decorrido esse tempo, verter as amostras em um equipamento para filtrar ("strainer") sobre recipiente de rejeito para NDF.

Enxaguar lentamente com 2 litros de água a 85-90°C.

Repetir o processo de enxágüe por um total de três enxágües.

Adicionar água gelada às amostras para auxiliar o resfriamento.

Drenar as sacolas e colocá-las em acetona por três minutos.

20 Espalhar a sacolas e deixar que sequem, no forno está ótimo, depois que a maior parte de acetona tenha saído.

Pesar as sacolas, coletar dados em uma Planilha designada NDF.

DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE REAL *IN VITRO*

25 1. Calibrar a balança e pesar 0,5 g (10,0 g para taxas de digestão) de amostra seca triturada (peneira de 1mm) em frascos Erlenmeyer de 125ml. Preparar 6 amostras padrão para cada banho usado.

2. Preparar os meios por adição dos ingredientes na ordem abaixo:

30 Número dos frascos: 24 48 78 110 166

Água destilada 500ml 1,00L 1,75 L 2,25 L 3,50 L

Trypticase® Peptona 2,5 g 5,0 g 9,75 g 11,25 g 17,5 g

Solução micromineral 0,125ml 0,25ml 0,438ml 0,563ml 0,880ml

Solução de tampão Rúmen 250ml 500ml 975ml 1,125 L 1,75 L

Solução macromineral 250ml 500ml 875ml 1,125 L 1,75 L

Resazurina 1,25ml 2,5ml 4,38ml 5,63ml 8,80ml

5 1,00 L 2,00 L 3,50 L 14,50 L 17,00 L

Misturar e adicionar 40ml por frasco. Os meios devem ser adicionados aos frascos pelo menos 1 hora antes da inoculação, para hidratar as amostras. Aquecer os banhos de água durante a noite.

3. Preparar a solução redutora:

10 Adicionar cloridrato de cisteína, H_2O , e NaOH e dissolver. Adicionar $Na_2S \cdot 9H_2O$ e dissolver novamente.

15 4. Enquanto a solução redutora está sendo misturada, colocar os frascos em banho de água. Colocar os frascos com uma amostra padrão em cada fileira disposta diagonalmente através do banho de água. Adicionar 2ml da solução redutora a cada frasco com pipeta repetidora Eppendorf. Tampar cada frasco com um tubo de descarga de CO_2 . Ligar o CO_2 e permitir que as amostras reduzam (a cor vermelha muda para transparente ou cor de chá), antes da adição do inóculo.

5. Preparar o inóculo:

20 Coletar fluido de rúmen e ingesta de animais fistulados 2 horas depois da alimentação (vacas são alimentadas a 7,00 h, coletar às 9,15 h). Manter o fluido em um recipiente térmico, que foi pré-aquecido com água quente da torneira. Verter água em balde e colocar o plugue de cânula nele para mantê-lo flexível. Formar um túnel através da camada de rúmen para
25 permitir que uma xícara de plástico atinja o rúmen ventral. Colocar uma camada de ingesta sobre o fluido e cobrir com uma tampa para eliminar qualquer espaço com ar. Recolocar os plugues de cânula bem justos. Transportar o fluido para o laboratório e colocá-lo sob CO_2 . Aproximadamente 2 L de fluido não processado são necessários para um conjunto de 166 amostras.
30 Combinar a mistura e ingesta em um misturador Waring de 3,78 litros, tomando cuidado para que a descarga de CO_2 continue. Revestir um funil de Buchner de plástico, grande, com uma camada de malha de náilon e passar

o inóculo misturado através dela. Espremer bem.

Usar somente digesto pancreático de caseína Trypticase® Peptona (Becton Dickinson BBL #4311921).

Número dos frascos: 24 48 78 110 166

5 Água destilada 48ml 95ml 167ml 261ml 356ml

L(+)Cisteína HCl.H₂O 313 mg 625 mg 1,094 g 1,719 g 2,344 g

NaOH 1N 2ml 4ml 7ml 11ml 15ml

Na₂S.9H₂O 313 mg 625 mg 1,094 g 1,719 g 2,344 g

50ml 100ml 175ml 275ml 375ml

10 Passar inóculos através da lã de vidro em um béquer de plástico grande para filtrar partículas pequenas.

O filtrado deve ser também mantido sob CO₂, o tempo todo, Transferir inóculos para uma garrafa que é anexada a um equipamento de pipetar Brinkman de 50mL.

15 Usar um equipamento de pipetar Brinkman, inocular cada frasco removendo primeiro a válvula de Bunsen, injetar 10ml de fluido, e repor a válvula. Esse procedimento descarregará CO₂ em cada frasco e expulsará qualquer O₂ presente. Girar a garrafa contendo fluido de rúmen durante a inoculação para manter as partículas suspensas.

20 6. Vedar os frascos, observar e corrigir quaisquer vazamentos de CO₂, e ajustar a pressão de CO₂ para produzir somente bolhas lentas no manômetro. A temperatura do banho de água durante toda a fermentação deve ser mantida em 40°C (100-102°F). Digerir as amostras por 30 h, a menos que especificado de outro modo. Para interromper a fermentação, re-
25 ver os frascos do banho e adicionar 20ml de solução de ND com o dispensador automático Unispense. Colocar uma rolha em cada frasco para impedir salpicos, e armazenar as amostras em refrigerador ou efetuar imediatamente o procedimento NDF.

30 7. Lavar o conteúdo dos frascos com 80ml de detergente neutro em um béquer Berzelius de 600ml. Adicionar 0,5 g de sulfito de sódio. Refluxar por 1 hora, cronometrada do início da ebulição. Adicionar aproximadamente 1 colher de chá de areia do mar purificada com ácido (Seasand, Fluka

Chemika #84880) em cadinhos Gooch limpos. Lavar e enxaguar com água quente até que a espuma desapareça, e duas vezes com acetona.

- Deixar a acetona evaporar por completo, secar os cadinhos durante a noite, a 100°C, calibrar a balança e pesar a quente. Levar as amostras a cinzas a 500°C, por 6 horas, resfriar para 200°C, e transferir para secagem em forno e pesar a quente o cadinho mais a cinza.

8. Calcular a digestibilidade real *in vitro* da matéria seca:

$IVTD = [1 - (N - CA)] \times 100$, onde N = cadinho + peso de resíduo de ND, CA = peso do cadinho vazio.

- 10 S = peso da matéria seca da amostra

9. Calcular a digestibilidade de NDF *in vitro*:

$IVCWD = [1 - ((N - CA) / (S \times F / 100))] \times 100$, onde N = cadinho + peso de resíduo de ND

CA = peso do cadinho vazio

- 15 S = peso da matéria seca da amostra

F = percentagem de NDF da amostra

10. Calcular as taxas de digestão, preparar um conjunto de 13 amostras a serem incubadas de 0 a 120 horas. Colocar todos os frascos em banhos de água e remover com o tempo. Processar os resíduos como listado acima. Calcular NDF remanescente como percentagem de NDF original para cada amostra. Usar ou um método de regressão não linear (JMP ou SAS) ou um procedimento de transformada de log, como a seguir: subtrair o resíduo indigerível (~120 horas) de cada fração.

- 25 Calcular o log natural (ln) de cada ponto e calcular a regressão linear do gráfico.

Inclinação dessa linha é a taxa de digestão da fração em questão.

- Esse método é uma modificação do procedimento de digestibilidade aparente *in vitro*. As etapas 1 a 5 são comuns em ambas as técnicas.
- 30 Da etapa 5, continuar abaixo com a etapa 6a para o método de Tilley-Terry.

6a. Depois de 48 horas de fermentação, adicionar, cuidadosamente, 2ml de HCl 6N a cada frasco para evitar excessiva formação de es-

puma. Isso reduzirá o pH para abaixo de 2. Adicionar 0,5 g de pepsina, e girar para dissolver. Adicionar 1ml de tolueno, recolocar os frascos em banho de água, e incubar por mais 48 horas.

- 7a. Remover os frascos do banho de água e filtrar em papel
- 5 Whatman #4, 41 ou 54, previamente tarado, sem aplicação de vácuo. Enxaguar o papel de filtro duas vezes por preenchimento com água quente e deixar drenar. Encher o filtro com acetona, deixar drenar e secar a ar. Dobrar os papéis, secar a 100°C, e pesar. Usar um fator de matéria seca, calculado em papéis separados, para corrigir quanto à tara nos papéis usados para filtra-
- 10 gem. Brancos separados, contendo inóculos e meios, mas sem amostra, e amostras de forragem padrão devem ser também analisadas.

8a. Calcular a digestibilidade aparente *in vitro* (Tilley-Terry):

IVDMD = $[1 - (R - F) - B] \times 100$, onde R = peso do papel de filtro e do resíduo

- 15 B = peso do branco de amostra

Referências:

Goering, H.K e P.J. Van Soest. 1970. Forage and Fiber Analysis. Agricultural Handbook Nº 379. Departamento Norte-Americano de Agricultura.

- 20 Tilley, J.M.A. e R.A. Terry, 1963. A two-stage technique of the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br Grassl. Soc. 18:104-111.

2/4/00 M.S. Allen, Dairy Nutrition and Forage Analysis Lab, Michigan State University.

Exemplo 3

- 25 Nocautes Duplos de CAD/COMT

- Co-expressão de construções de *dsRNAi* para CAD & COMT conduzidas pelo promotor OsMADs6 pode ser obtida em uma construção simples. Eventos de milho transgênico contendo tais construções são produzidos usando o protocolo de transformação estabelecido no Exemplo 1. As
- 30 seqüências do promotor OsMADs6 e as construções de RNAi são como apresentadas, e as análises estabelecidas acima são usadas para determinar o teor de lignina, etc. Sabugos com teor reduzido de lignina produzidos u-

sando este método pode ser usado do mesmo modo e para os mesmos propósitos que aqueles produzidos usando os plasmídios da Figura 1 ou 2.

Exemplo 4

5 Uso de Material de Planta com Baixo Teor de Lignina em Conversões de Biomassa

Uma das limitações de converter biomassa em etanol é a necessidade de um pré-tratamento químico severo para separar as fibras da planta que estão "coladas" umas as outras por lignina. O propósito desta invenção é que quanto mais baixo o teor de lignina, mais facilmente as fibras podem ser separadas, pré-tratamento menos severo é usado, menos perda de glicose durante o pré-tratamento, menos enzima requerida para hidrolisar a biomassa e um maior rendimento de álcool. Um exemplo da tecnologia usando sabugo de milho é apresentado, contudo, é óbvio que esse resultado pode ser estendido para outras fontes de plantas. A produção de etanol de biomassa de celulose é discutida por Badger, P.C., Ethanol from cellulose: A general review. pp. 17-21, J. Janick e A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA., 2002.

Pré-tratamento-sacarificação-fermentação padrão

Oito gramas de sabugo finamente triturados são suspensos com 80ml de uma solução a 1% de hidróxido de sódio e aquecidos por 1 hora, a 130°C. O pH é então ajustado para pH 5 e 100 mg de levedura seca mais 20 unidades de papel de filtro (FPU) de celulose são adicionados e deixados fermentar por 20 horas. A cerveja resultante seria analisada quanto ao etanol e a expectativa é de que seriam obtidos em torno de 3% v/v, como é usualmente obtido da biomassa de fermentação.

Pré-tratamento-sacarificação-fermentação de sabugo com baixo teor de lignina

Oito gramas de sabugo finamente triturados são suspensos com 80ml de uma solução a 1% de hidróxido de sódio e aquecidos por 1 hora, a 130°C. O pH é então ajustado para pH 5 e 100 mg de levedura seca mais 15 FPU de celulose são adicionados e deixados fermentar por 20 horas. A cerveja resultante seria analisada quanto ao etanol e a expectativa é que mais

etanol seria produzido que os sabugos triturados padrão na faixa de cerca de 3% v/v.

Exemplo 5

5 Análise composicional do sabugo e dados preliminares hidrolíticos.

Análise composicional de sabugos de milho

Esse exemplo descreve a análise composicional de sacarídeo para glicose, xilose, arabinose, e manose de sabugos de milho com baixo teor de lignina. A principal análise composicional de sacarídeo foi determinada para três variedades de sabugo de milho: CPM913 (Controle de Isolinhagem, genótipo A), CPM914 (mutante BM3, genótipo BM3), e CPM916 (mutante BM3, genótipo B). A composição foi determinada realizando-se hidrólise com ácido forte (H_2SO_4 a 72%), por uma hora, seguida por hidrólise com ácido diluído aquecido (H_2SO_4 a 4%, a 121°C, por 1 hora) e neutralização com carbonato de cálcio. As concentrações de monômeros individuais de sacarídeo foram determinadas via Índice de Refração – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (RI-HPLC). Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

20 Análise composicional de amostras de sabugo em triplicata. Amostras de sabugo não foram analisadas quanto ao teor de ferulato, lignina ou de cinzas.

Análise Composicional, amostras de sabugo					
	glicose	xilose	arabinose	manose	TOTAL
CPM 913	35%	21%	2,9%	0,3%	60%
CPM 914	37%	23%	3,2%	0,3%	60%
CPM 916	39%	23%	2,9%	0,1%	60%
Desvios Padrão					
CPM 913	2,4%	0,2%	0,1%	0,1%	2,4%
CPM 914	3,7%	2,1%	0,0%	0,0%	5,4%
CPM 916	1,1%	0,5%	0,1%	0,0%	0,9%

Hidrólise Enzimática de Sabugos de Milho

do nos brotos ou na fruta.

Os seguintes exemplos são dados a título de ilustração e explanação, e não têm como objetivo limitar a invenção, em qualquer modo.

EXEMPLOS

5 Exemplo 1

Transformação de Agrobactéria do Milho – Embriões Imaturos

Preparação da Orelha

Colher orelhas quando os embriões imaturos nos grãos centrais são de aproximadamente 0,5 a 1,0 mm.

- 10 Debulhar e esterilizar as orelhas em uma solução de 20% de Clorox e 3 gotas de Tween/litro de solução. Colocar em um agitador orbital por 20 minutos.

Enxaguar as orelhas, três vezes, com ddH₂O estéril.

- 15 Em um ambiente estéril, cortar os topos dos grãos. Colocar a orelha em uma placa de Petri e isolar os embriões imaturos.

Preparar a solução de inoculação para transformação

- A 100ml de meio de LP-Lsinf., adicionar 50 µL de solução de estoque de acetosiringona (AS) (40 mg/ml de estoque/ml) para uma concentração final de 100 µM de AS.
- 20 • Pipetar 4ml (2,5) do meio de infecção em 10ml de tubo descartável.
- Preparar tubos Eppendorf para coletar os embriões nesse momento e adicionar ~1,4ml do meio de infecção com AS a eles.

Preparação de suspensão de Agrobactéria

- 25 • Tomar uma alça Agrobactéria e re-suspendê-la por turbilhamento em um tubo descartável de 10ml com 4ml (2,5ml) de meio de infecção.
- Medir a densidade óptica da suspensão de Agrobactéria. Ajustar a OD₆₆₀ para aproximadamente 0,45 a 0,55.

30 Isolamento de Embriões Imaturos e Transformação

- Excisar os embriões e colocá-los no topo do meio de infecção em um tubo Eppendorf.

Excisar os embriões por 30 a 35 minutos para obter um total de ~150 embriões.

- Turbilhonar os embriões (agitar manualmente) por 5 segundos.
- Impingir termo-choque aos embriões em banho de água a 45°C, por 5 minutos. Não deixar que a tampa do tubo Eppendorf entre em contato com a água (possíveis problemas de contaminação).

• usar uma pipeta descartável para remover o meio de infecção e substituir com 1,5 de suspensão de Agrobactéria. Turbilhonar por 30 segundos.

- Deixe que o tubo assente por 5 minutos.
- Agitar o tubo para suspender os embriões e verter em uma placa de Petri com meio AS 500 modificado com LS.

• Pipetar a suspensão de Agrobactéria e transferir os embriões para uma área da placa que não tenha sido exposta à Agrobactéria.

- Ter certeza absoluta que todos os embriões estão com o lado do escutelo para cima.

Co-cultivo

- Co-cultivar embriões e a Agrobactéria, a 23°C, por 2 a 3 dias.

Indução de calos nos embriões/somática

- Transferir o tecido (18 embriões/placa) para o meio de pré-seleção/indução de calos por 10 a 14 dias a 28°C, no escuro.

Seleção da Manose

- Transferir grupos de calos no Meio de Seleção. 9 grupos por placa. Cultivar por aproximadamente 2 semanas a 28°C, no escuro.
- Checar as culturas quanto à contaminação e resposta de calos e cultivar por mais 2 semanas a 28°C, no escuro.

Transferir 4 eventos por placa de tecido de crescimento para o meio de regeneração de MS (R1) e deixar no escuro por 10 a 14 dias.

- Transferir tecido em crescimento/plantas de 4 eventos por placas para a luz, por 14 dias, no claro.

Transferir os eventos para meios de formação de raízes em recipientes de cultura de tecido (2 eventos/ recipiente Greiner).

Milho transgênico foi crescido na estufa para o estágio T0 ou T1, e amostras de sabugo ou de outros materiais foram selecionadas dos eventos transgênicos produzidos. Os plasmídios mostrados na Figura 1 e Figura 2 mostram os plasmídios (pSyn12210 contendo a construção CAD RNAi, e pSyn12345 contendo a construção COMT RNAi) usados no protocolo de transformação de milho dado acima.

Exemplo 2

Seleção de evento T1 CAD pSyn12210

As amostras de sabugo T1 de um total de 15 eventos (10 de cópia baixa, 3 média e 2 alta) incluem 65 linhagens (28 linhagens de cópia baixa, 14 de cópia média, 5 de cópia alta e 18 nula para controle) foram enviadas para análise de MSU para NDF (fibra), ADL (lignina), IVNDFD (digestibilidade de NDF *in vitro*). 3 isolinhagens BM3 e 2 checagens de híbridos foram também incluídos. Comparamos a diferença entre as linhagens (transgênicas versus nulas) do mesmo evento, entre os eventos, ou entre os eventos de cópia baixa, média e alta com os controles positivos BM3 ou negativos e checagem de híbridos. Embora alguns destas tenham ficado nas 16 linhagens de topo mencionadas abaixo, nenhuma destas mostrou redução consistente de lignina nos testes futuros. Os dados estão na Tabela 1 e os métodos usados para análise são dados abaixo.

Seleção de evento T1 COMT (PsYN 12345)

Análise do sabugo T1: 41 eventos totais (23 de cópia baixa, 13 de média, e 5 de alta) incluem 131 linhagens (24 linhagens de cópia baixa, 13 de média, 8 de alta e 20 de nulo para controle) foram enviados para MSU para análises (ADL, NDF, IVNDFD), isolinhagens 3BM3, uma de controle JHAX707 e uma para checagem de híbridos foram também incluídas.

Análise de sabugo T1: As 7 linhagens de topo contendo pSyn12210 ou pSyn12345 foram selecionadas com base no teor de lignina e dados de digestibilidade *in vitro*. Essas linhagens mostraram redução do teor de lignina e aperfeiçoada digestibilidade em comparação com o sabugo de controle conforme mostrado na Tabela 1. Os dados referentes aos dois melhores eventos contendo plasmídio pSyn12345 estão apresentados na Tabe-

la 2.

Tabela 1

Características de ensilagem de eventos selecionados contendo nocautes de RNAi ou de COMT. Em 2 resíduos genéticos em comparação com linhagens nulas do mesmo evento. DM = matéria seca, NDF = Fibra Detergente Neutra, ADF = Fibra Detergente Ácida, IVTD = Digestibilidade real *in vitro*, IVNDFD = Desaparecimento de NFD *in vitro*.

Evento	Nocaute de Gene	Cruzamento	Geração	% DM	5 CINZAS	% NDF	% ADF	% Lignina	% IVTD	% IVNDFD
				MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
1	Nulo CAD	1	T2	89,4	2,6	67,0	37,1	5,0	59,6	39,9
				89,3	3,1	64,9	35,2	4,3	64,3	45,0
				-0,1	0,5	-2,1	-1,9	-0,7	4,7	5,1
2	Nulo CAD	1	T2	90,5	1,2	76,6	41,9	5,5	53,0	38,7
				89,5	2,7	70,9	39,3	5,1	59,8	43,5
				-0,7	1,5	-5,7	-2,6	-0,5	6,7	4,8
3	Nulo COMT	1	T2	94,0	3,2	77,1	44,7	6,6	49,4	34,4
				94,3	3,1	75,6	43,7	5,8	53,5	38,5
				0,3	-0,1	-1,5	-0,9	-0,8	4,1	4,1
4	Nulo COMT	1	T1	92,4	2,5	77,1	45,2	6,8	48,8	33,6
				90,1	3,4	75,6	43,2	6,0	53,3	38,3
				-2,2	0,9	-1,5	-2,1	-0,8	4,5	4,7

Evento	Nocaute de Gene	Cruzamento	Geraçao	% DM	5 CINZAS	% NDF	% ADF	% Lignina	% IVTD	% IVNDFD
4	Nulo COMT	1	T2	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
				88,8	3,4	78,9	45,3	6,6	50,1	36,7
				87,7	3,1	72,7	40,6	5,7	57,0	40,9
5	Nulo COMT	1	T2	-1,1	-0,2	-6,2	-4,7	-0,9	7,0	4,2
				89,0	2,7	78,2	44,8	6,8	51,0	37,4
				88,8	3,4	70,5	39,2	5,6	59,0	42,2
6	Nulo COMT	1	T2	-0,2	0,7	-7,7	-5,6	-1,2	7,9	4,7
				89,8	2,4	82,6	46,7	6,6	43,3	31,4
				89,6	3,1	78,8	43,7	5,8	50,8	37,6
7	Nulo COMT	2	T1	-0,2	0,6	-3,9	-3,0	-0,8	7,5	6,2
				n/a	n/a	n/a	n/a	6,3	n/a	n/a
				n/a	n/a	n/a	n/a	5,6	n/a	n/a
	Bmr isogênico			89,5	3,4	84,7	48,3	6,1	47,7	38,3
	Bmr normal			89,5	3,2	80,1	42,4	1,7	73,2	66,6
				0	-0,2	-4,6	-5,9	-4,4	25,5	28,3

Tabela 2

Dados mostrando redução consistente em % de lignina e aumento em % de IVNDFD para 2 eventos de topo

Evento		Lignina (%)		IVNDFD (%)		
		Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2	Expt 3
3	Nulo	6,6	5,6	34,4	35,8	27,1
	COMT	5,8	4,9	38,5	40,0	31,4
6	Nulo	6,6		31,4	33,0	
	COMT	5,8	6,2	37,6	40,3	31,6
Bm3*		1,7		66,6	68,0	53,5
Bm3 iso		6,1		38,3	41,2	34,2

Para metodologias gerais aplicáveis a essas análises, vide:

- 5 Goering, H.K., e P.J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses. Apparatus, Reagents, Procedures, and some applications. Agric. Handbook N° 379. ARS-USDA.

ADF – Fibra Detergente Ácida – (método Van Soest)

- 10 Realizada em capela química, com equipamento apropriado que inclui jaleco resistente a produtos químicos, capa para laboratório, luvas de borracha resistente a produtos químicos, óculos de segurança.

- 15 O método de ADF hidrolisa os componentes da parede celular que inclui pectinas e hemicelulose. A fração remanescente, chamada de ADF contém celulose, lignina e cinzas. Ela é expressa como porcentagem da fração da parede celular total.

O resíduo de ADL é gerado a partir da fração de ADF, e representa lignina + cinzas.

- 20 A etapa inicial é para recuperar a fração da parede celular de um tecido de planta particular. Em outras palavras ela eliminará compostos solúveis, tais como açúcares, proteínas, óleo e fibra solúvel. Se a amostra contém uma grande quantidade de óleo (tal como sementes de soja) então lavagem com acetona é requerida (inicialmente triturar, então usar um tubo de vidro, ou tempo de incubação em tubo de plástico curto). O tecido é secado e triturado em partículas de não mais que 2 mm de tamanho. Tipicamente,

cerca de 2 a 3 g de tecido são adicionados a um tubo cônico de 50ml. Então, 40ml de etanol a 80% são adicionados, e misturados por 5 horas em um agitador giratório. Uma outra lavagem é requerida durante a noite. Então, 40ml de água são adicionados durante uma lavagem de 1 hora, repetindo a lavagem em um total de 3 vezes. Algum tecido será perdido durante as trocas de solução. Uma lavagem preliminar deve ser feita para estimar a quantidade de tecido inicial para produzir cerca de 1 g de amostra de parede celular final.

No caso de tecido de sabugo, devido ao teor de parede celular ser muito alto, não há necessidade de se fazer uma preparação da parede celular. Assim, as análises de ADF e ADL serão calculadas com base no total de matéria seca.

Solução de ADF

2% de CTAB em H₂SO₄ 1N

(para 1 litro de estoque, adicionar 20 g de CTAB para 900ml de água deionizada (di), agitar por poucos minutos até redução do tamanho de partícula. Então, adicionar 62,5ml de ácido sulfúrico 16N (Fisher A298-212, 98%, densidade de 1,84 g/ml). Conforme o ácido é adicionado, a mistura de CTAB + água/ácido se torna solubilizada. Preencher para 1 L com água deionizada.

A solução de ADF pode ser também adquirida da ANKOM (www.ankom.com).

Registrar o peso da sacola da ANKOM.

Pesar 250 mg de uma amostra secada a ar (de com/ou sem incubação a 37°C de amostra seca).

Verter no saco de filtro (tipo F57) da ANKOM; registrar o peso.

Vedar com termo-vedador.

Adicionar a um béquer de vidro Pyrex de 2.000ml, tipicamente 20 sacolas (24 max.) com 500ml da solução ADF. Cobrir com placa Pyrex de 1.000ml. Colocar em placa de vidro (Pyrex, diâmetro de 190 mm X 100 mm de altura), preenchida com água em ebulição. Adicionar, também, algumas pedras de PTFE em ebulição à placa. A água deve ser mantida em ebulição

por 1 hora. Agitar os sacos a cada 15 minutos.

Enxaguar no mínimo 4 vezes com H_2O a 85-90°C. Todo o rejeito líquido é descartado em uma pia com água corrente contínua. Mais dois minutos de enxágüe com pequeno volume de acetona, que é então descartada em recipiente com rejeito de solvente.

Secar a 70°C, em forno, durante a noite.

Pesar tecido residual = ADF.

ADL – Lignina Detergente Ácida

Realizada em capela química, com equipamento apropriado que inclui jaleco resistente a produtos químicos, capa para laboratório, luvas de borracha resistente a produtos químicos, óculos de segurança.

Ao resíduo de ADF seco (20-40 sacolas), adicionar 500ml de ácido sulfúrico a 72%, cobrir todas as sacolas.

Usar um béquer de vidro Pyrex de 2.000ml, com 20 sacolas (24 no máximo) e cobrir com uma placa Pyrex de 1.000ml.

NOTA: ácido sulfúrico a 72% pode ser preparado por adição de 750ml de ácido concentrado (95%) em 250ml de água. Cuidado: a mistura é muito quente e requer que o ácido seja vertido lentamente para evitar projeções. A garrafa é ainda colocada em um banho de água à temperatura ambiente (2 enxágües) para resfriamento rápido e uso. Pode-se também adquirir o H_2SO_4 a 72% da Ankom.

Incubar na temperatura ambiente, por 3 horas, agitar várias vezes.

Excesso de ácido é descartado em rejeito de ácido líquido.

Então enxaguar, pelo menos cinco vezes com água quente (85 a 90°C). As lavagens são realizadas na pia.

Enxágüe final em acetona por 2 minutos, descartar o solvente em um contêiner para lixo.

Secar em forno, a 70°C, durante a noite.

Pesar o tecido residual = ADL

Análise de Fibra Detergente Neutra

Preparar as amostras conforme recomendação do protocolo de

trituração padrão, sem usar o Triturador Perten Hammer.

Colocar as amostras na balança seca para avaliar o teor de umidade da mistura.

Numerar as sacolas com marcador resistente a solvente.

5 Registrar o peso das sacolas de amostra seca, vazias, Ankom.

Tomar a amostra seca e pesar 0,5 g da amostra seca em sacolas de filtro Ankom.

Vedar as amostras com termo-vedador.

10 Dissolver 20 g de Sulfito de Sódio (0,5/50ml de solução de NDF) em 2.000ml de solução de NDF.

Ligar o aquecedor até atingir ebulição, uma vez em ebulição adicionar a amostra nas sacolas e cobrir soltamente.

Ajustar o cronômetro para 105 minutos.

15 Depois de decorrido esse tempo, verter as amostras em um equipamento para filtrar ("strainer") sobre recipiente de rejeito para NDF.

Enxaguar lentamente com 2 litros de água a 85-90°C.

Repetir o processo de enxágüe por um total de três enxágües.

Adicionar água gelada às amostras para auxiliar o resfriamento.

Drenar as sacolas e colocá-las em acetona por três minutos.

20 Espalhar a sacolas e deixar que sequem, no forno está ótimo, depois que a maior parte de acetona tenha saído.

Pesar as sacolas, coletar dados em uma Planilha designada NDF.

DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE REAL *IN VITRO*

25 1. Calibrar a balança e pesar 0,5 g (10,0 g para taxas de digestão) de amostra seca triturada (peneira de 1mm) em frascos Erlenmeyer de 125ml. Preparar 6 amostras padrão para cada banho usado.

2. Preparar os meios por adição dos ingredientes na ordem abaixo:

30 Número dos frascos: 24 48 78 110 166

Água destilada 500ml 1,00L 1,75 L 2,25 L 3,50 L

Trypticase® Peptona 2,5 g 5,0 g 9,75 g 11,25 g 17,5 g

Solução micromineral 0,125ml 0,25ml 0,438ml 0,563ml 0,880ml

Solução de tampão Rúmen 250ml 500ml 975ml 1,125 L 1,75 L

Solução macromineral 250ml 500ml 875ml 1,125 L 1,75 L

Resazurina 1,25ml 2,5ml 4,38ml 5,63ml 8,80ml

5 1,00 L 2,00 L 3,50 L 14,50 L 17,00 L

Misturar e adicionar 40ml por frasco. Os meios devem ser adicionados aos frascos pelo menos 1 hora antes da inoculação, para hidratar as amostras. Aquecer os banhos de água durante a noite.

3. Preparar a solução redutora:

10 Adicionar cloridrato de cisteína, H_2O , e NaOH e dissolver. Adicionar $Na_2S \cdot 9H_2O$ e dissolver novamente.

15 4. Enquanto a solução redutora está sendo misturada, colocar os frascos em banho de água. Colocar os frascos com uma amostra padrão em cada fileira disposta diagonalmente através do banho de água. Adicionar 2ml da solução redutora a cada frasco com pipeta repetidora Eppendorf. Tampar cada frasco com um tubo de descarga de CO_2 . Ligar o CO_2 e permitir que as amostras reduzam (a cor vermelha muda para transparente ou cor de chá), antes da adição do inóculo.

5. Preparar o inóculo:

20 Coletar fluido de rúmen e ingesta de animais fistulados 2 horas depois da alimentação (vacas são alimentadas a 7,00 h, coletar às 9,15 h). Manter o fluido em um recipiente térmico, que foi pré-aquecido com água quente da torneira. Verter água em balde e colocar o plugue de cânula nele para mantê-lo flexível. Formar um túnel através da camada de rúmen para
25 permitir que uma xícara de plástico atinja o rúmen ventral. Colocar uma camada de ingesta sobre o fluido e cobrir com uma tampa para eliminar qualquer espaço com ar. Recolocar os plugues de cânula bem justos. Transportar o fluido para o laboratório e colocá-lo sob CO_2 . Aproximadamente 2 L de fluido não processado são necessários para um conjunto de 166 amostras.
30 Combinar a mistura e ingesta em um misturador Waring de 3,78 litros, tomando cuidado para que a descarga de CO_2 continue. Revestir um funil de Buchner de plástico, grande, com uma camada de malha de náilon e passar

o inóculo misturado através dela. Espremer bem.

Usar somente digesto pancreático de caseína Trypticase® Peptona (Becton Dickinson BBL #4311921).

Número dos frascos: 24 48 78 110 166

5 Água destilada 48ml 95ml 167ml 261ml 356ml

L(+)Cisteína HCl.H₂O 313 mg 625 mg 1,094 g 1,719 g 2,344 g

NaOH 1N 2ml 4ml 7ml 11ml 15ml

Na₂S.9H₂O 313 mg 625 mg 1,094 g 1,719 g 2,344 g

50ml 100ml 175ml 275ml 375ml

10 Passar inóculos através da lã de vidro em um béquer de plástico grande para filtrar partículas pequenas.

O filtrado deve ser também mantido sob CO₂, o tempo todo, Transferir inóculos para uma garrafa que é anexada a um equipamento de pipetar Brinkman de 50mL.

15 Usar um equipamento de pipetar Brinkman, inocular cada frasco removendo primeiro a válvula de Bunsen, injetar 10ml de fluido, e repor a válvula. Esse procedimento descarregará CO₂ em cada frasco e expulsará qualquer O₂ presente. Girar a garrafa contendo fluido de rúmen durante a inoculação para manter as partículas suspensas.

20 6. Vedar os frascos, observar e corrigir quaisquer vazamentos de CO₂, e ajustar a pressão de CO₂ para produzir somente bolhas lentas no manômetro. A temperatura do banho de água durante toda a fermentação deve ser mantida em 40°C (100-102°F). Digerir as amostras por 30 h, a menos que especificado de outro modo. Para interromper a fermentação, remover os frascos do banho e adicionar 20ml de solução de ND com o dispensador automático Unispense. Colocar uma rolha em cada frasco para impedir salpicos, e armazenar as amostras em refrigerador ou efetuar imediatamente o procedimento NDF.

30 7. Lavar o conteúdo dos frascos com 80ml de detergente neutro em um béquer Berzelius de 600ml. Adicionar 0,5 d de sulfito de sódio. Refluxar por 1 hora, cronometrada do início da ebulição. Adicionar aproximadamente 1 colher de chá de areia do mar purificada com ácido (Seasand, Fluka

Chemika #84880) em cadinhos Gooch limpos. Lavar e enxaguar com água quente até que a espuma desapareça, e duas vezes com acetona.

- 5 Deixar a acetona evaporar por completo, secar os cadinhos durante a noite, a 100°C, calibrar a balança e pesar a quente. Levar as amostras a cinzas a 500°C, por 6 horas, resfriar para 200°C, e transferir para secagem em forno e pesar a quente o cadinho mais a cinza.

8. Calcular a digestibilidade real *in vitro* da matéria seca:

IVTD = $[1 - (N - CA)] \times 100$, onde N = cadinho + peso de resíduo de ND, CA = peso do cadinho vazio.

- 10 S = peso da matéria seca da amostra

9. Calcular a digestibilidade de NDF *in vitro*:

IVCWD = $[1 - ((N - CA) / (S \times F / 100))] \times 100$, onde N = cadinho + peso de resíduo de ND

CA = peso do cadinho vazio

- 15 S = peso da matéria seca da amostra

F = percentagem de NDF da amostra

10. Calcular as taxas de digestão, preparar um conjunto de 13 amostras a serem incubadas de 0 a 120 horas. Colocar todos os frascos em banhos de água e remover com o tempo. Processar os resíduos como listado acima. Calcular NDF remanescente como percentagem de NDF original para cada amostra. Usar ou um método de regressão não linear (JMP ou SAS) ou um procedimento de transformada de log, como a seguir: subtrair o resíduo indigerível (~120 horas) de cada fração.

- 25 Calcular o log natural (ln) de cada ponto e calcular a regressão linear do gráfico.

Inclinação dessa linha é a taxa de digestão da fração em questão.

- Esse método é uma modificação do procedimento de digestibilidade aparente *in vitro*. As etapas 1 a 5 são comuns em ambas as técnicas.
- 30 Da etapa 5, continuar abaixo com a etapa 6a para o método de Tilley-Terry.

6a. Depois de 48 horas de fermentação, adicionar, cuidadosamente, 2ml de HCl 6N a cada frasco para evitar excessiva formação de es-

puma. Isso reduzirá o pH para abaixo de 2. Adicionar 0,5 g de pepsina, e girar para dissolver. Adicionar 1ml de tolueno, recolocar os frascos em banho de água, e incubar por mais 48 horas.

- 7a. Remover os frascos do banho de água e filtrar em papel Whatman #4, 41 ou 54, previamente tarado, sem aplicação de vácuo. Enxaguar o papel de filtro duas vezes por preenchimento com água quente e deixar drenar. Encher o filtro com acetona, deixar drenar e secar a ar. Dobrar os papéis, secar a 100°C, e pesar. Usar um fator de matéria seca, calculado em papéis separados, para corrigir quanto à tara nos papéis usados para filtração. Brancos separados, contendo inóculos e meios, mas sem amostra, e amostras de forragem padrão devem ser também analisadas.

8a. Calcular a digestibilidade aparente *in vitro* (Tilley-Terry):

IVDMD = $[1 - (R - F) - B] \times 100$, onde R = peso do papel de filtro e do resíduo

- 15 B = peso do branco de amostra

Referências:

Goering, H.K e P.J. Van Soest. 1970. Forage and Fiber Analysis. Agricultural Handbook Nº 379. Departamento Norte-Americano de Agricultura.

- 20 Tilley, J.M.A. e R.A. Terry, 1963. A two-stage technique of the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br Grassl. Soc. 18:104-111.

2/4/00 M.S. Allen, Dairy Nutrition and Forage Analysis Lab, Michigan State University.

Exemplo 3

- 25 Nocautes Duplos de CAD/COMT

- Co-expressão de construções de *dsRNAi* para CAD & COMT conduzidas pelo promotor OsMADs6 pode ser obtida em uma construção simples. Eventos de milho transgênico contendo tais construções são produzidos usando o protocolo de transformação estabelecido no Exemplo 1. As seqüências do promotor OsMADs6 e as construções de RNAi são como apresentadas, e as análises estabelecidas acima são usadas para determinar o teor de lignina, etc. Sabugos com teor reduzido de lignina produzidos u-
- 30

sando este método pode ser usado do mesmo modo e para os mesmos propósitos que aqueles produzidos usando os plasmídios da Figura 1 ou 2.

Exemplo 4

5 Uso de Material de Planta com Baixo Teor de Lignina em Con- versões de Biomassa

Uma das limitações de converter biomassa em etanol é a necessidade de um pré-tratamento químico severo para separar as fibras da planta que estão "coladas" umas as outras por lignina. O propósito desta invenção é que quanto mais baixo o teor de lignina, mais facilmente as fibras podem ser separadas, pré-tratamento menos severo é usado, menos perda de glicose durante o pré-tratamento, menos enzima requerida para hidrolisar a biomassa e um maior rendimento de álcool. Um exemplo da tecnologia usando sabugo de milho é apresentado, contudo, é óbvio que esse resultado pode ser estendido para outras fontes de plantas. A produção de etanol de biomassa de celulose é discutida por Badger, P.C., Ethanol from cellulose: A general review. pp. 17-21, J. Janick e A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA., 2002.

Pré-tratamento-sacarificação-fermentação padrão

Oito gramas de sabugo finamente triturados são suspensos com 80ml de uma solução a 1% de hidróxido de sódio e aquecidos por 1 hora, a 130°C. O pH é então ajustado para pH 5 e 100 mg de levedura seca mais 20 unidades de papel de filtro (FPU) de celulose são adicionados e deixados fermentar por 20 horas. A cerveja resultante seria analisada quanto ao etanol e a expectativa é de que seriam obtidos em torno de 3% v/v, como é usualmente obtido da biomassa de fermentação.

Pré-tratamento-sacarificação-fermentação de sabugo com baixo teor de lignina

Oito gramas de sabugo finamente triturados são suspensos com 80ml de uma solução a 1% de hidróxido de sódio e aquecidos por 1 hora, a 130°C. O pH é então ajustado para pH 5 e 100 mg de levedura seca mais 15 FPU de celulose são adicionados e deixados fermentar por 20 horas. A cerveja resultante seria analisada quanto ao etanol e a expectativa é que mais

etanol seria produzido que os sabugos triturados padrão na faixa de cerca de 3% v/v.

Exemplo 5

5 Análise composicional do sabugo e dados preliminares hidrolíticos.

Análise composicional de sabugos de milho

Esse exemplo descreve a análise composicional de sacarídeo para glicose, xilose, arabinose, e manose de sabugos de milho com baixo teor de lignina. A principal análise composicional de sacarídeo foi determinada para três variedades de sabugo de milho: CPM913 (Controle de Isolinhagem, genótipo A), CPM914 (mutante BM3, genótipo BM3), e CPM916 (mutante BM3, genótipo B). A composição foi determinada realizando-se hidrólise com ácido forte (H_2SO_4 a 72%), por uma hora, seguida por hidrólise com ácido diluído aquecido (H_2SO_4 a 4%, a 121°C, por 1 hora) e neutralização com carbonato de cálcio. As concentrações de monômeros individuais de sacarídeo foram determinadas via Índice de Refração – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (RI-HPLC). Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

20 Análise composicional de amostras de sabugo em triplicata. Amostras de sabugo não foram analisadas quanto ao teor de ferulato, lignina ou de cinzas.

Análise Composicional, amostras de sabugo					
	glicose	xilose	arabinose	manose	TOTAL
CPM 913	35%	21%	2,9%	0,3%	60%
CPM 914	37%	23%	3,2%	0,3%	60%
CPM 916	39%	23%	2,9%	0,1%	60%
Desvios Padrão					
CPM 913	2,4%	0,2%	0,1%	0,1%	2,4%
CPM 914	3,7%	2,1%	0,0%	0,0%	5,4%
CPM 916	1,1%	0,5%	0,1%	0,0%	0,9%

Hidrólise Enzimática de Sabugos de Milho

Esse experimento foi conduzido para determinar os sacarídeos produzidos a partir de vários sabugos de milho mediante hidrólise enzimática.

Uma tela de primeira passagem foi iniciada usando altas concentrações de sabugo de milho. CPM914 e CPM916 são reduzidos genótipos de lignina A e B, respectivamente. Reações amplas (100 mg de sabugo de milho em pedaços) foram preferidas devido à natureza heterogênea e de curso do substrato – as reações, em geral, foram efetuadas em tubos Eppendorf, em vez de placas de microtitulação. Extratos de enzima de sobrenadantes fúngicos e um coquetel otimizado em fibra de milho foram testados quanto às atividades de hidrólise em três tipos de sabugo. As reações estavam em escala de 1ml contendo a) 100 mg de sabugo em pedaços, suplementados com b) 50 µg de enzimas fúngicas de *Cochliobolus heterotrophus* ("cokie") e 200 µg de enzimas de *Aspergillus niger*, d) um coquetel de xilanase-esterase contendo 2 xilanases, uma α -arabinofuronosidase, uma β -xilosidase, uma ácido ferúlico esterase e uma acetil xilano esterase. O coquetel de xilanase continha: 25 µg de BD13509, 125 µg de BD2157, 62,5 µg de BD13715 e BD13457. O coquetel de esterase continha: 100 µg de BD14441 e BD14104.

Os resultados são apresentados na Tabela 4. Quando foi usado o coquetel de enzimas definido, a hidrólise foi mais alta em ambas as variedades de sabugo com lignina reduzida em comparação ao sabugo de variedade regular. Embora o coquetel de xilanase-esterase não tenha sido otimizado para hidrólise de sabugo, o coquetel apresentou uma atividade surpreendentemente alta em sabugo, com melhor atividade nos mutantes de lignina inferiores. Note que não existem enzimas de degradação de celulose presentes no coquetel de enzimas: se essas enzimas são adicionadas, pode ser possível aumentar ainda mais a hidrólise dos sabugos.

Tabela 4

Hidrólise enzimática de três variedades de sabugo de milho em pedaços para monômero de açúcar, expresso em porcentagem de peso seco.

	Ponto de tempo de 48 horas, carga de 10% de fibras				
	glucobiose	glicose	xilose	arabinose	Total
Controle de CPM913	0%	2,1%	0%	0%	2,1%
"Cokie" induzido por fibra	0%	3,7%	0,9%	0,1%	4,7%
"Cokie" + 200 µg de enzima fúngica	0,1%	9,3%	7,7%	0,5%	17,6%
Coquetel de xilase-esterase	1,0%	2,9%	5,7%	0%	9,6%
Açúcar disponível CPM913		35,5%	20,9%	2,9%	59,8%
Controle de CPM914	0,3%	2,9%	0%	0%	3,2%
"Cokie" induzido por fibra	0,1%	3,1%	0,5%	0%	3,7%
"Cokie" + 200 µg de fibra	0%	7,1%	8,5%	0,7%	16,3%
Coquetel de xilase-esterase	1,2%	3,1%	8,5%	0%	12,8%
Açúcar disponível CPM914		37,0%	23,4%	3,2%	64,1%
Controle de CPM916	0%	2,9%	0%	0%	2,9%
"Cokie" induzido por fibra	0,2%	3,2%	0,5%	0%	3,9%
"Cokie" + 200 µg de enzima fúngica	0,1%	7,9%	10,8%	0%	18,9%

	Ponto de tempo de 48 horas, carga de 10% de fibras				
	glucobiose	glicose	xilose	arabinose	Total
Coquetel de xilana-se-esterase	0,8%	2,4%	6,8%	0,2%	10,2%
Açúcar disponível CPM916		38,8%	22,8%	2,9%	64,8%
coquetel de xilanase: 25 µg de BD13509, 125 µg de BD2157 e BD13457 coquetel de esterase: 100 µg de BD14441 e BD14104 Enzimas de "cokie" adicionadas em 50 µg					

Hidrólise enzimática de sabugos de milho incluindo também glicanases, celulasas e glicuronidase

A relação positiva entre os coquetéis de enzimas definidas e CPM913/CPM914 foi ainda explorada, desta vez adicionando outras glicanases, celulasas, e uma glicuronidase. A reações de hidrólise estavam em escala de 1 mml, 25 mg/ml de sabugo de milho em pedaços incubados por 48 horas, a 37°C, em um agitador de tubo Eppendorf. O coquetel de xilana-se-esterase é o mesmo que o do Exemplo 2 (10ml de coquetel de xilanase: 4ml de 13509, 20 µg de 2157, 10 µg de 13715 e 13457). Enzimas adicionais foram adicionadas ao coquetel: 10 µg de α-Glicuronidase BD12669; 100 µg de coquetel de celulose de *Trichoderma reesi*; 10 µg de glicanase COM516; glicanase com coquetel de esterase (10ml de coquetel de esterase: 100 µg de BD14104 e 100 µg de BD14441); ou um coquetel contendo todas as acima (exceto a α-Glicuronidase). Com coquetéis de enzimas definidos, o substrato de sabugo de milho de baixo teor de lignina é mais suscetível ao ataque enzimático. A adição de um extrato de celulose aumenta a hidrólise global para 21,8%, ou 34% do total de açúcar disponível. Uma reação similar usando fibra de milho rende 5,4%, um substrato para o qual as enzimas foram otimizadas.

A mesma tendência de melhor digestibilidade foi vista nas amostras de sabugo com baixo teor de lignina (Tabela 5). De particular interesse foi a habilidade de esterases e celulasas em aumentar a quantidade de xilose hidrolisada no sabugo de baixo teor de lignina. Uma combinação de co-

quetel de xilanase e celulasas foram capazes de converter 34% da açúcar disponível em monômero no sabugo de baixo teor de lignina, em comparação a somente 25% no sabugo do tipo selvagem.

Tabela 5

- 5 É mostrada a hidrólise de dois tipos de sabugo em pedaços usando coquetéis de enzimas definidos – fibra de milho não tratada. Os números são expressos como porcentagem de peso seco.

Sabugo de milho em pedaços (genótipo A de controle de isolinhagem)				
	Glicose	Xilose	Arabinose	TOTAL
Controle	2,8%	0%	0%	2,8%
coquetel de xilanase	3,5%	3,7%	0,2%	7,4%
xilanase com esterase	2,9%	3,4%	0,2%	6,5%
coquetel de X-E com a-Gln	2,8%	3,8%	0,2%	6,8%
xilanase com celulase	11,4%	3,8%	0,3%	15,5%
glicanase CPM516	2,5%	0,0%	1,3%	3,8%
CPM516 com esterase	2,4%	0%	0%	2,4%
CPM516-X-E com celulase	9,3%	4,4%	0,2%	13,9%
Açúcar disponível CPM914	35%	21%	3%	60%

Sabugo de milho em pedaços com baixo teor de lignina (genótipo A de mutante BM3)				
	Glicose	Xilose	Arabinose	TOTAL
Controle	3,0%	0%	0%	3,0%
coquetel de xilanase	2,6%	3,8%	0,2%	6,6%
xilanase com esterase	3,1%	5,7%	0,2%	9,0%
coquetel de X-E com a-Gln	3,2%	5,6%	0,3%	9,0%
xilanase com celulase	13,0%	8,5%	0,3%	21,8%
glicanase CPM516	3,0%	0%	0%	3,0%
CPM516 com esterase	3,0%	0%	0%	3,0%
CPM516-X-E com celulase	13,4%	8,8%	0,3%	22,5%
Açúcar disponível CPM914	37%	23%	3%	64%

Fibra de milho não tratada (com 20% de amido aderente)				
	Glicose	Xilose	Arabinose	TOTAL
Controle	2,6%	0%	0%	2,6%
coquetel de xilanase	2,7%	0,2%	0,4%	3,3%
xilanase com esterase	2,9%	0,2%	0,3%	3,4%
coquetel de X-E com α -Gln	3,0%	0,3%	0%	3,3%
xilanase com celulase	4,7%	0,3%	0,4%	5,4%
glicanase CPM516	2,9%	0%	0,4%	3,2%
CPM516 com esterase	2,9%	0%	0%	2,9%
CPM516-X-E com celulase	4,5%	0,3%	0,3%	5,1%
Açúcar disponível CPM711	44%	19%	10%	76%

O benefício da digestibilidade aperfeiçoada de ensilagem de milho na ingestão de matéria seca e produção de leite em vacas leiteiras foi demonstrado por Ballard et al., J. Dairy Sci. 84:442-452 (2001), e por Oba e Allen, J. Dairy Sci. 82:135-142 (1999). Experiências similares de alimentação são estabelecidas para uso de sabugos de milho com baixo teor de lignina da presente invenção para demonstração de benefícios similares que resultam da digestibilidade aperfeiçoada demonstrada acima, e como mostrada na Figura 3.

Certas seqüências são particularmente úteis na prática da presente invenção. Essas seqüências são mostradas abaixo:

SEQ ID No: 1. Seqüência de Promotor: OsMADS 6

ctaggacgatggtgtgatgtgggaacacgaagaaaacatgaggaaaaatataaaatgaatttccacttaaaatgcatcaaat
 aaaaaataaagaaacgaccgggaatagacacagggltgtgaactagctaggcaaacatcatatggcccttgctgatgca
 caagtacattgagatgtcattcaattctgtgcatcatatgcatgtgtcccttgctgaataattactctgaaatatctaccagtccaatct
 attgcatgacttaaltaattcacaggltgtgtgattacattattagtaagcttgagagcacaagctcaatggattttctataaatggggat
 cattttgcaattttctgtcgtgcaaagttagccttcttattactactctgttttaaatatacgatcctattgacttttggtcatatatttaacca
 tgtatcttatttagatagtttgcgcaaatatataccttcaatgataaaattagttacaatgaacaaaatgatatttcgcaattcttttac
 taacaagtacaagaagtacctgcagcaatatagttgaaccgtagtagatcgagcctagctacgcaaaaaacaaaaa
 gagaaaaaagggaaggaaaaacattaatcatgcatgagcagtagtcccggcaactggaattgtcaaagatatggggaga
 ggagaataatacaagtactactactacctagctaccatgcatatgcaccaaaggcaaacgtgattattggataaagcacagat
 gctggcaaaacaatccttaagcctcccctccctgcttcttttttgggcagcctctaccggacggtgacctgtggtgaccagta
 ggtggcgacatacatggttgggttaagctagtagagcagtggtgtgctgcgcgcaagagagagagactgtgagctgggagta
 gccctctcccctccttgccatctcctgtgtatgtcatatgtcatcatcgcaacggtgtatattgtgtgtggcggtgtggcattg
 gattgccccattttggtcgtgctcccagttagggttaaacctgtggttaacctgtctagccccacgcaaaagtaccctcttattgtt

SEQ ID NO: 2 Sequência de RNAi de CAD K/O (PSyn 12210)

gtaaaatctagctcttttggtttttggcattttcccgctaagtatagagtttatgtggataacattataactttcaagatccaatccac
atctttgatgtgaaaaatcatacaatagggaatacaactgaagggtaattagatgctatatgcatatataatataatgtgcgcgcgc
gcgcgcctgaatttaactatgtatgcatccaactglttcattgaaaaagattgatattttcagctctattcttttcgagtatatattaatgt
ttcaatcigtgttgaccattataagataaagccclatttcaccaggcatttgagatgatctttcatgcatgaaaaagcgtgtgtatcactt
caactaaccagacgatcgaacatgtattgtataagaaacagaccttgatttccctctgtaaaaatcatgcatgtgttcgtttgaattgga
gtcggcgcgctgtgtttgaccgtcaggaaagcttttttccctgaatagtcgaagggctatacttctgaagcaattgggacactaat
caattattgtttataccfcggaccatcttttccctctcacaccctaatacagtttatgccttggaccattaattgtgtgttcacaagcttctgt
ttatgtttacaaagcattcgcctagatttgtgtgtgtctctacacatcgatcactttaaatactgtgccttcagttattcttttaacgtttgt
tattatcttatttaaaaaaaltatcgtattattatttttggttgtgatttactttattatcaaaagtattcaaatatgacttattctttttataagt
gcactaattttcaaaataagatgaatggcacaatgttacaagaaaaagttaaagcaaccacaaatttagggcggaggtaglaaaac
clagtattgtaaccaataattttalcaatctataaatgcaacacaaagtcacttcgtgatatctcacacaaagccacttcaacgatga
aagctgacgtcatgtttatcaaaacacatgtgatcagtttgttggaataaaaaaattatctatgtcataaatcaagagttataatataa
gctctggctctacaagtaacatttctatgtttttttacgttctacatactatgtttgccaaaaaaacatgatcatttgttgacgaaa
agaaataglaaatatagagtgaccttgataltataataagcttctgcctctataaataacatctatgcacttttacgctgtagta
atttgatatatagaaaatttacaataaacattttctgcagcataaccacc

SEQ ID NO: 3. Seqüência de RNAi de COMT/KO (pSyn 12345)

COMT-Volta

5'atggggagcctggcgccgagaggaaggtggtcgggtgggcccaggagccaccggacacctctccccctactcctac
 accctcaggaacacaggccctgaagatgtgtgtgaaggtgctctactgcgggatctgccacacggacatccaccaggccaa
 gaaccacctcggggcttcaaagtatcctatggccctgggcacgaggtggtcggcgaggtggtggaggtcgggcccagggtggc
 caagtacggcgctggcgacgtggtaggcgtcgggtgatcgttgggtgctgccgcgagtgagccccctgcaaggccaacgttga
 gcagtactgcaacaagaagatcgggtcatacaacgacgtctacactgatggacggcccacgcagggtggattcgccctc 3'

- Embora a invenção acima tenha sido descrita em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para propósitos de clareza e entendimento, ficará claro para aqueles versados na técnica que certas alterações e
- 5 modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações apenas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar a biossíntese de lignina em uma planta transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão de uma enzima na planta, a enzima selecionada do grupo que consiste em CAD e COMT, em que a infra-regulação é obtida usando RNAi de fita dupla.
5
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a planta é milho.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que a infra-regulação está localizada no sabugo da planta de milho.
- 10 4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a construção de RNAi de fita dupla compreende a SEQ ID NO:2.
5. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a construção de RNAi de fita dupla compreende SEQ ID NO:3.
6. Método para controlar a biossíntese de lignina em uma planta transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão dos genes de COD e COMT de uma planta usando RNAi de fita dupla.
7. Construção de RNAi selecionada do grupo que consiste em a sequência SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3.
8. Método para controlar a biossíntese de lignina nos sabugos
20 de uma planta de milho transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão de o gene de CAD, o gene de COMT, ou ambos os genes, nos sabugos da planta de milho usando uma ou mais construções de RNAi de fita dupla, cuja expressão está sob o controle de um promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo.
- 25 9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que o promotor é o promotor de SEQ ID NO:1.
10. Método para controlar a biossíntese de lignina nos sabugos de uma planta de milho transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão de o gene CAD, o gene COMT, ou ambos os genes, nos
30 sabugos da planta de milho usando uma ou mais construções de RNAi de fita dupla compreendendo SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, ou ambas, em que as construções são conduzidas pelo promotor de SEQ ID NO:1.

11. Método para a produção de etanol, em que o método compreende o uso de biomassa compreendendo material de um sabugo de milho de baixo teor de lignina produzido pelo processo conforme definido na reivindicação 8, em um processo de produção de etanol.

5 12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que o sabugo de milho com baixo teor de lignina é produzido pelo método conforme definido na reivindicação 10.

10 13. Método para aumentar a produção de leite em um animal pela alimentação do animal com uma ração que compreende material proveniente de sabugo de milho com baixo teor de lignina, produzido pelo método conforme definido na reivindicação 8.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, em que o sabugo com baixo teor de lignina é produzido pelo método conforme definido na reivindicação 10.

15. Método para aumentar o rendimento nutricional da ração de um animal através da alimentação do animal com uma ração que compreende material proveniente de um sabugo de milho de baixo teor de lignina produzido pelo método conforme definido na reivindicação 8.

20 16. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que o sabugo de milho com baixo teor de lignina é produzido pelo método conforme definido na reivindicação 10.

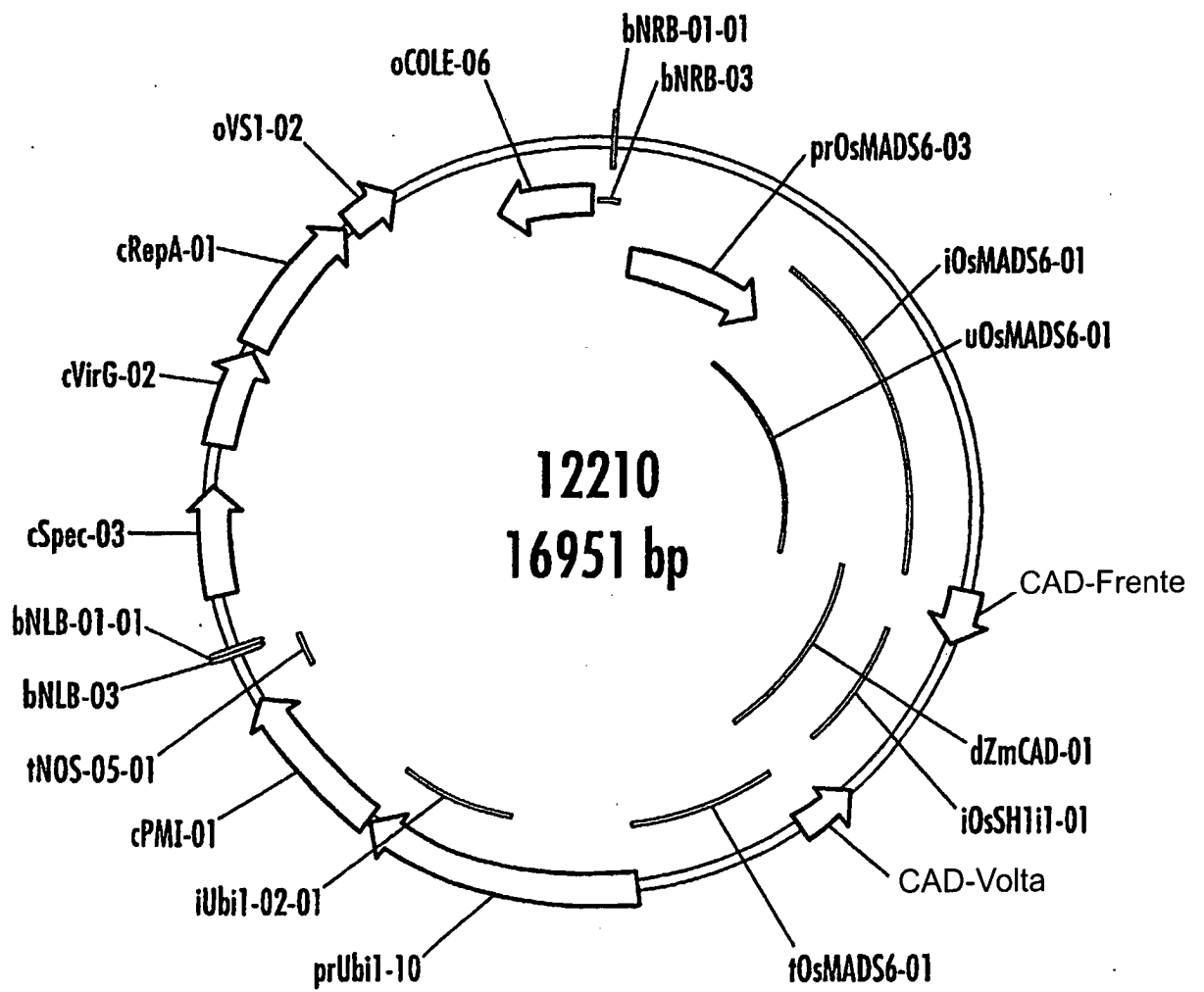


FIG 1

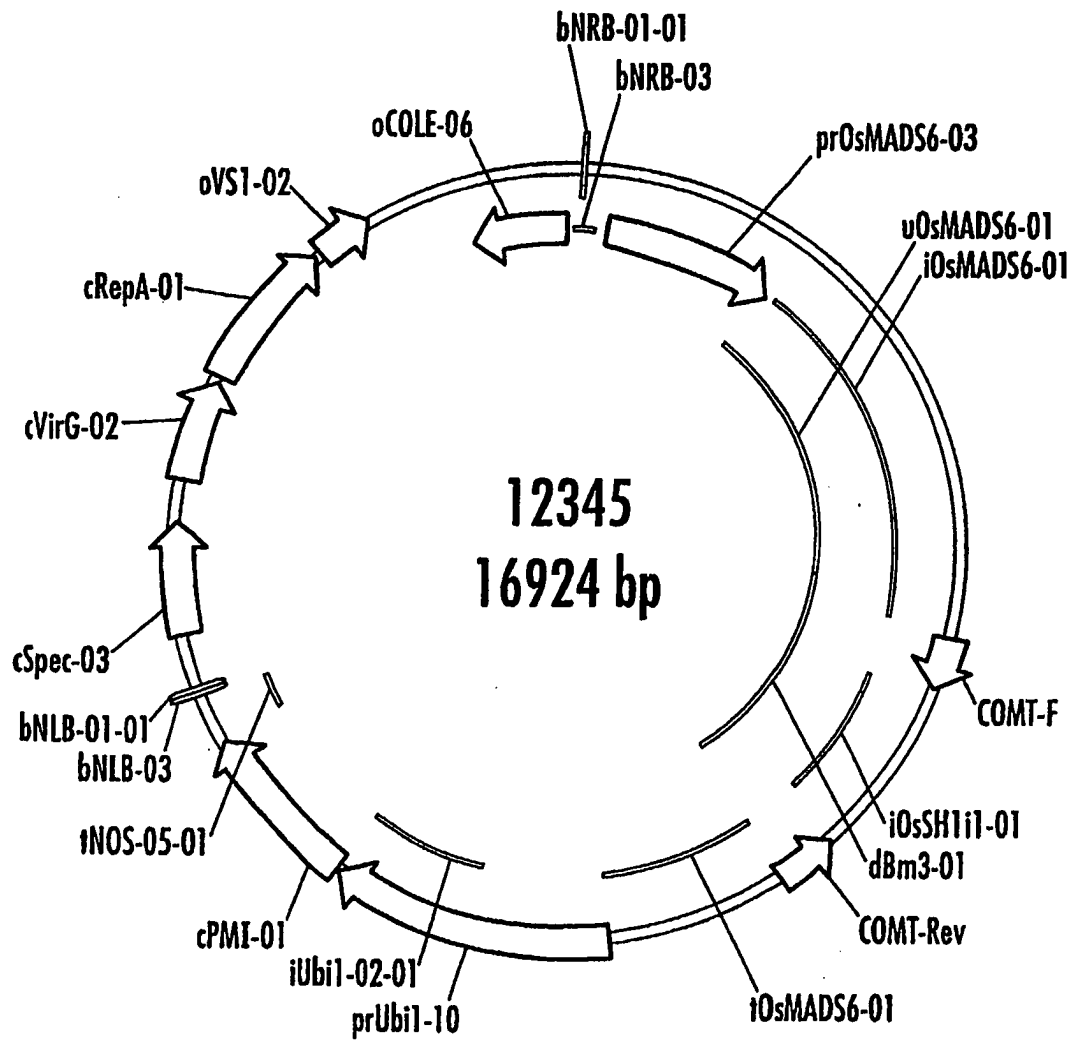


FIG 2

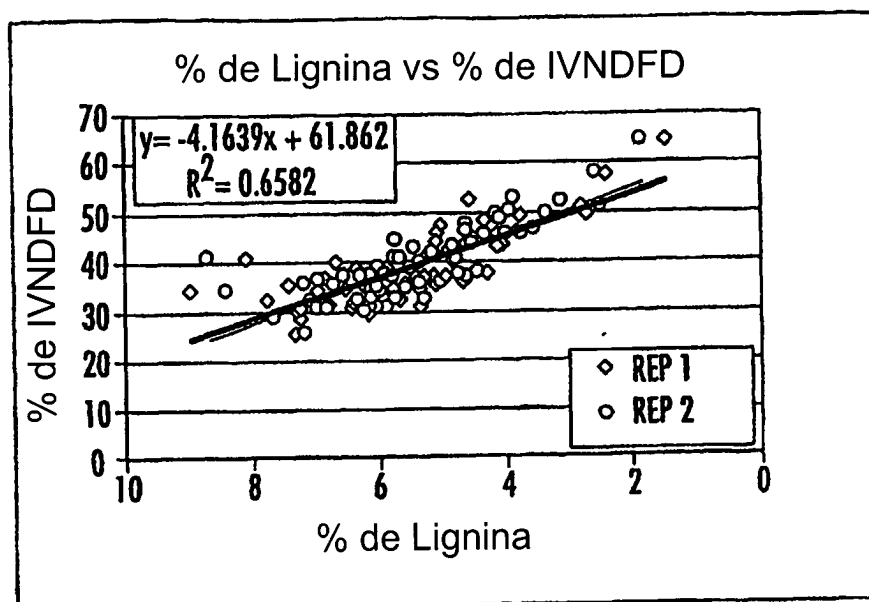


FIG 3

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS E CONSTRUÇÕES GENÉTICAS PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO".

- 5 A presente invenção refere-se a métodos e construções genéticas para o controle de expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina em plantas. O método envolve o uso de RNAi de fita dupla para infra-regular ou nocautear a expressão dos genes CAD e COMT. Em modalidades particulares, o método envolve o uso de promotores específicos para
- 10 sabugo e preferidos para sabugo para infra-regular a biossíntese de lignina nos sabugos de plantas de milho.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS E CONSTRUCTOS GENÉTICOS PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO".

Reivindicação de Prioridade

- 5 Este pedido reivindica a prioridade do pedido de Patente US60/665.685, depositado em 28 de março de 2005, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência.

Campo da Invenção

- 10 A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia agrícola. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao uso de tecnologia de RNAi para modificar a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina no milho, e mais especificamente em sabugos de milho.

Antecedentes da Invenção

- 15 Lignina é um polímero aromático heterogêneo complexo que torna as membranas impermeáveis e reforça as paredes de certas células das plantas.

- 20 Lignina é formada por polimerização de radicais livres derivados de monolignóis, tais como álcoois paracumarílicos, coniferílicos e sinapílicos (Higuchi, 1985, em Biosynthesis and degradation of wood components (T. Higuchi, ed.), Academic Press, Orlando, Fla. pp. 141-160). A lignina é formada por polimerização de pelo menos três monolignóis diferentes que são sintetizados em uma via de multietapas, em que cada etapa na via é catalisada por uma enzima diferente. Tem sido mostrado que a manipulação de várias cópias de genes que codificam certas enzimas, tais como álcool cinnamílico desidrogenase (CAD) e ácido caféico 3-O-metiltransferase (COMT)
- 25 resulta na modificação da quantidade de lignina produzida; vide, por exemplo, Patente US Nº 5.451.514 e Publicação de PCT WO 94/23044. Além disso, tem sido mostrado que a expressão anti-sentido de seqüências que codificam CAD em choupo leva à produção de lignina tendo uma composição
- 30 modificada (Grand, C, et al., Planta (Berl.) 163:232-237 (1985)).

Ligninas têm uma ampla variação em seu conteúdo relativo de

monolignóis, como função da espécie e dos vários tecidos dentro da mesma planta.

Essa variação é provavelmente causada e controlada por diferentes atividades e especificidades dos substratos, as enzimas necessárias para a biossíntese de monômeros de lignina (Higuchi, 1985, *loc. cit.*).

Além de seu papel na estrutura das plantas, a lignina representa um componente principal da biomassa terrestre e assume uma grande significância econômica e ecológica (Brown, 1985, J. Appl. Biochem. 7, 371-387; Whetten e Sederoff, 1991, Forest Ecology and Management, 43, 301-316).

No nível de exploração da biomassa, é apropriado primeiro notar que a lignina é um fator limitativo da digestibilidade e rendimento nutricional de plantas de forragem. De fato, está claramente demonstrado que a digestibilidade das plantas de forragem por ruminantes é inversamente proporcional ao teor de lignina nestas plantas, em que a natureza das ligninas é também um fator determinante neste fenômeno (Buxton e Roussel, 1988, Crop. Sci., 28, 553-558; Jung e Vogel, 1986, J. Anim., Sci., 62, 1703-1712).

Dentre as principais plantas para forragem nas quais seria de interesse reduzir os teores de lignina podem ser mencionados lucerna, capim-do-prado e forragem de milho usados para ensilagem.

Deve ser também observado que altos teores de lignina são, em parte, responsáveis pela limitada qualidade da torta de girassol destinada à alimentação de gado, e à redução das capacidades germinativas de certas sementes no setor hortícola.

Pode ser enfatizado que a lignificação intensa que resulta durante a conservação dos componentes da planta depois da colheita rapidamente rende produtos tais como aspargo, inhame, cenouras, etc. inadequados para consumo.

Além disso, é também apropriado notar que mais que 50 milhões de toneladas de lignina são extraídos de materiais lígneos, cada ano, no contexto da produção de polpa de papel na indústria de papel. Essa operação de extração, que é necessária para obter celulose, é dispendiosa em energia, e, em segundo lugar, causa poluição através dos compostos quími-

cos usados para a extração, que são encontrados no ambiente (Dean e Eriksson, 1992, *Holzforschung*, 46, 135-147; Whetten e Sederoff, 1991, *loc. cit.*).

Reduzir as proporções de ligninas (que perfazem até 20 a 30% da matéria seca, dependendo da espécie) para um pouco por cento (2 a 5%) representaria um aumento do rendimento e uma substancial economia (produtos químicos) e contribuiria para melhorar o ambiente (redução da poluição). Dada à escala de uso de material líneo, esses decréscimos teriam repercussões extremamente significantes. Nesse caso, as espécies envolvidas seriam choupo, eucalipto, *Acacia magnium*, o gênero *Casuarina* e todos angiospermas e gimnospermas usados na produção de polpa de papel.

Está claro que nos dois setores em consideração, a redução dos níveis de ligninas deve ser moderada para conservar as características de rigidez e a arquitetura normal da planta (ou da árvore), já que as ligninas que reforçam as paredes celulares desempenham um significativo papel na manutenção do hábito ereto das plantas.

As variações naturais nos teores de lignina observados na natureza para as mesmas espécies (desvios que podem ser de até 6 a 8% da matéria secada entre os indivíduos) justificam as reduções sugeridas acima.

A resistência à degradação da lignina, como as dificuldades encontradas no contexto de sua extração, é provavelmente devido à estrutura complexa de seu polímero, que é feito de ligações de éter e ligações carbono-carbono entre os monômeros, bem como às numerosas ligações químicas que existem entre a lignina e os outros componentes da parede celular (Sarkanen e Ludwig, 1971, em *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions* (K.V. Sarkanen e C. H. Kudwig ed.), Nova Iorque: Wiley—Interscience, pp. 1-18).

Uma abordagem para tentar reduzir o nível de ligninas em plantas por engenharia genética consistiria em inibir a síntese de uma das enzimas na cadeia da biossíntese dessas ligninas indicadas acima.

Uma técnica particularmente adequada no contexto de tal abordagem é usar mRNA anti-sentido, que é capaz de hibridizar o mRNA, que

codifica essas enzimas, e, conseqüentemente, previne, pelo menos em parte, a produção destas enzimas de seu mRNA correspondente.

Tal estratégia de anti-sentido efetuada com a ajuda do gene que codifica a CAD em tabaco foi o objeto do Pedido de Patente EP Nº 584 117, que descreve o uso de mRNA anti-sentido que é capaz de inibir a produção de ligninas em plantas por hibridização com o mRNA, que codifica a CAD nessas plantas.

Os resultados nas plantas transformadas demonstram desse modo uma redução na atividade da CAD, mas paradoxalmente os teores de ligninas não mostraram alteração. Estudos complementares indicam que as ligninas de plantas transformadas são diferentes das ligninas de controle, já que os aldeídos cinamílicos são incorporados diretamente no polímero de lignina.

Milho "Brown mid rib" (Bmr) tem sido usado como alternativa para aperfeiçoar a digestibilidade para híbridos de ensilagem, por décadas. O aperfeiçoamento nas ingestões e digestibilidade de ruminantes é derivado do teor de lignina reduzido em híbridos mutados de Bmr. A mutação de Bm 1 é relativamente branda e causa poucos efeitos pleiotróficos, mas proporciona menos aperfeiçoamento na digestibilidade que Bm3, tem sido menos estudado, e não tem sido comercialmente desenvolvido. A mutação de Bm3 é a característica de Bm mais bem estudada, ela proporciona características superiores de digestibilidade, mas à custa de desempenho agrônômico moderadamente pobre. Bm3 é a base da existência de produtos comerciais. A característica de Bm1 é causada por atividade reduzida da enzima biossintética, CAD, e a característica de Bm3 é causada por atividade reduzida de uma enzima biossintética, COMT.

As seguintes referências de base são aqui incorporadas a título de referência: Patentes US 6.441.272; US 6.855.864; US 6.610.908; US 5.451.514; US 5.866.791; US 5.959.178; US 6.066.780; US 6.211.432; US 5.981.837; US 5.850.020; US 6.204.434; e US 6.610.521; Pedidos de Patente US20020081693 e US 20030159170; Pedidos PCT WO 2004080202; WO 03054229; Pedido de Patente Europeu EP 1425401; e Piquemal et al., Plant

Physiology 130:1675 – 1685 (2002); Vignols et al., The Plant Cell 7:407-416 (1995); Morrow et al., Molecular Breeding 3:351 – 357 (1997). Essas referências discutem vários aspectos da biossíntese de lignina em plantas, e o controle deles. Em especial, as Patentes US 5.451.514; US 5.959.178; e US 6.066.780 são particularmente importantes com respeito ao ensinamento referente ao papel de expressão de CAD e de COMT na biossíntese de lignina em plantas.

Células e tecidos de plantas podem responder à lesão mecânica, química ou induzida por patógeno por produção de vários compostos fenólicos incluindo precursores de lignina mono ou dimetoxilada derivados de ácido cinâmico via uma série complexa de reações bioquímicas. Esses precursores de lignina são eventualmente usados pela planta para produzir o polímero de lignina que auxilia no reparo do ferimento por adição de hidrofobicidade, uma barreira física contra infecção por patógeno e resistência mecânica ao tecido lesionado (Vance, C. P., et al., 1980, Annu Rev Phytopathol 18:259-288). Biossíntese dos precursores de lignina mono ou dimetoxilada ocorre, em parte, pela ação de duas enzimas, ácido caféico 3-O-metiltransferase (COMT), também conhecida como ácido caféico/ácido 5-hidroxiferúlico O-metiltransferase e cafeoil CoA 3-O-metiltransferase (CCOMT). Ambas as enzimas têm sido isoladas e purificadas a partir de uma ampla variedade de espécies de plantas.

Estudos mostraram que as atividades de COMT e CCOMT aumentam antes da deposição de lignina (Inoue, K., et al., Plant Physiol 117(3):761-770). A síntese de precursores de lignina envolve a metilação de ácido caféico para produzir ácido ferúlico seguido por 5-hidroxilação do ferulato, então uma segunda metilação para render sinapato. COMT está envolvida na metilação tanto do ácido caféico como do ácido 5-hidroxiferúlico (Inoue, K., et al., 1998, Plant Physiol 117(3):761-770). Pesquisa indica que transcritos de COMT estão presentes em altos níveis nos órgãos contendo tecido vascular e um estudo sugere que a inibição de anti-sentido de COMT pode levar ao teor de lignina e composição modificado no xilem ou floema do tecido de planta transgênica (Dwivedi, U., et al., 1994, Plant Mol. Biol. 26:61-

71).

Uma tecnologia promissora para obtenção de silenciamento de gene marcado é baseada em RNA de filamento duplo (dsRNA) que induz reposta ao chamado silenciamento de gene pós-transcricional ou de interferência de RNA (RNAi). RNA de filamento duplo foi introduzido em várias espécies diferentes, incluindo nematódeos, moscas de frutas, *Trypanosoma*, fungos, plantas. Vide, por exemplo, WO9932619. Algum sucesso limitado tem sido também demonstrado em mamíferos, especificamente em oócitos e embriões de camundongo. A introdução do dsRNA apropriado inibe a expressão de gene em um modo dependente de sequência, um efeito que tem sido usado extensivamente em *C. elegans* e em *D. melanogaster* como uma ferramenta genética para estudar a função do gene. Por exemplo, 00/01846 descreve métodos para caracterizar a função do gene usando inibição de dsRNA. Contudo, a inibição de dsRNA tem sido aplicada com pouco sucesso em sistemas de mamíferos.

Por causa da importância das ligninas na arquitetura da parede celular e digestibilidade, e por causa da agronomia desfavorável de milho Bmr, há considerável interesse nos prospectos para alterar a quantidade ou a qualidade de lignina por engenharia genética. Assim, há um grande acordo de interesse na identificação dos genes que codificam proteínas envolvidas na produção de lignina em plantas e na modificação da expressão de tais genes, por exemplo, pelo uso de métodos de RNAi. Esses métodos podem ser usados em células de planta para controlar a produção de lignina. Tais métodos teriam significativa utilidade na produção de material de planta com aperfeiçoada digestibilidade, e se direcionados ao decréscimo do teor de lignina dos sabugos de milho, poderiam evitar o aspecto inferior agrônomico do fenótipo de Bmr.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona métodos e constructos de expressão genética úteis no controle da biossíntese de lignina em plantas, e particularmente em milho, e mais particularmente nos sabugos das plantas de milho. Em um exemplo específico, a tecnologia de RNAi de filamento du-

plo é utilizada para diminuir a expressão de (ou para neutralizar) tanto os genes de álcool cinamílico desidrogenase (CAD) do milho como os genes de ácido caféico O-metil transferase (COMT) do milho. Modalidades preferidas envolvem os genes knockouts CAD ou COMT especificamente no sabugo de milho para reduzir o teor de lignina. Isso proporcionará digestibilidade aperfeçoada de fibra não-digerível no sabugo, que aperfeiçoaria a digestibilidade da planta inteira por ruminantes. Limitando a expressão das características similares a BM somente ao sabugo, o tecido mais altamente lignificado, proporcionaria ainda aumento atrativo na digestibilidade da planta toda, mas mitigaria a maior parte do risco associada ao pobre desempenho agrônômico, tais como depósito aumentado e pobre rendimento de matéria seca, como ocorre com mutações de Bmr, que está associado à sua expressão sistêmica. Portanto, os eventos de neutralização de CAD ou de COMT foram gerados usando tecnologia de RNAi de filamento duplo com OsMAD6, um promotor específico de sabugo.

A presente invenção refere-se a um método para controlar a biossíntese de lignina em uma planta, em que o método compreende infra-regular a expressão de uma enzima na planta, a enzima selecionada do grupo que consiste em CAD e COMT, em que a infra-regulação é obtida usando RNAi de filamento duplo. O método refere-se também à infra-regulação de expressão de ambas as enzimas; aos constructos de dsRNAi; e aos constructos específicos para sabugo/preferidos para sabugo. A presente invenção refere-se também ao uso dos sabugos, com baixo teor de lignina, produzidos utilizando o método da invenção em aplicações de conversão de biomassa (por exemplo, na produção de etanol) e em aplicações de ração (por exemplo, em ração de animal para produção aumentada de leite, particularmente vacas leiteiras).

Breve Descrição dos Desenhos

- A figura 1 é uma representação do plasmídeo pSyn12210.
- A figura 2 é uma representação do plasmídeo pSyn12345.
- A figura 3 é um gráfico mostrando que conforme o teor de lignina aumenta, a digestibilidade de material de sabugo diminui.

Descrição Detalhada

Definições

Para clareza, certos termos usados no relatório descritivo são definidos e apresentados como a seguir:

- 5 "Associado a/operativamente ligado" refere-se às duas seqüências de ácido nucléico que estão relacionadas física ou funcionalmente. Por exemplo, um promotor ou seqüência de DNA reguladora é dito estar "associado a" uma seqüência de DNA que codifica um RNA ou a uma proteína se as duas seqüências estiverem operativamente ligadas, ou situadas de modo
- 10 que a seqüência de DNA reguladora afetará o nível de expressão da codificação ou da seqüência de DNA estrutural.

- Um "constructo quimérico" é uma seqüência de ácidos nucléicos recombinantes no qual um promotor ou seqüência de ácidos nucléicos reguladora é operativamente ligada a ou associada a uma seqüência de ácidos
- 15 nucléicos que codifica mRNA ou que é expressa como uma proteína, de modo que a seqüência de ácidos nucléicos reguladora é capaz de regular a transcrição ou expressão da seqüência de ácidos nucléicos associada. A seqüência de ácidos nucléicos reguladora do constructo quimérico é normalmente operativamente ligada à seqüência de ácidos nucléicos associada,
- 20 como encontrada na natureza.

- Co-fator: reagente natural, tal como molécula orgânica ou íon de metal, requerido em uma reação catalisada por enzima. Um co-fator é, por exemplo, NAD(P), riboflavina (incluindo FAD e FMN), folato, molibdoproteína, tiamina, biotina, ácido lipóico, ácido pantotênico e coenzima A, S-
- 25 adenosilmetionina, piridoxal fosfato, ubiquinose, menaquinona. Opcionalmente, um co-fator pode ser regenerado e reusado.

- Uma "seqüência de codificação" é uma seqüência de ácidos nucléicos que é transcrita em RNA tal como mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, RNA sentido ou RNA anti-sentido. Preferivelmente, o RNA é então traduzido em
- 30 um organismo para produzir uma proteína.

Complementar: "complementar" refere-se a duas seqüências de nucleotídeos que compreendem seqüências de nucleotídeos antiparalelas

capazes de emparelhamento, uma com a outra, mediante formação de ponte de hidrogênio entre os resíduos de base complementares nas seqüências de nucleotídeos antiparalelas.

Atividade enzimática: significa aqui a capacidade de uma enzima em catalisar a conversão de um substrato em um produto. Um substrato para a enzima compreende o substrato natural da enzima, mas também compreende análogos do substrato natural, que podem ser também convertidos pela enzima em um produto ou em um análogo de um produto. A atividade da enzima é medida, por exemplo, por determinação da quantidade do produto na reação depois de certo período de tempo, ou por determinação da quantidade de substrato que permanece na mistura reacional depois de certo período de tempo. A atividade da enzima é também medida por determinação da quantidade de um co-fator da reação, não usado, que permanece na mistura reacional depois de certo período de tempo ou por determinação da quantidade de co-fator usado na mistura reacional depois de certo período de tempo. A atividade da enzima é também medida por determinação da quantidade de um doador de energia livre ou molécula rica em energia (por exemplo, ATP, fosfoenolpiruvato, fosfato de acetila ou fosfocreatina) que permanece na mistura reacional depois de certo período de tempo ou por determinação da quantidade de um doador usado de energia livre ou molécula rica em energia (por exemplo, ADP, piruvato, acetato ou creatina) na mistura reacional depois de certo período de tempo.

Cassete de Expressão: "Cassete de expressão", como usado aqui, significa uma molécula de ácido nucléico capaz de direcionar a expressão de uma particular seqüência de nucleotídeos em uma célula hospedeira apropriada, compreendendo um promotor operativamente ligado à seqüência de interesse, que está operativamente ligada a sinais de terminação. Ela também compreende, tipicamente, seqüências requeridas para tradução própria da seqüência de nucleotídeo. A região de codificação codifica usualmente uma proteína de interesse, mas pode também codificar um RNA funcional de interesse, por exemplo, RNA anti-sentido ou RNA não-traduzido, na direção sentido e anti-sentido. O cassete de expressão que

compreende a seqüência de nucleotídeos de interesse por ser quimérico, significando que pelo menos um de seus componentes é heterólogo com respeito ao pelo menos um de seus outros componentes. O cassete de expressão pode ser também um que ocorre naturalmente, mas que tenha sido
5 obtido em uma forma recombinante útil para expressão heteróloga. Tipicamente, contudo, o cassete de expressão é heterólogo com respeito ao hospedeiro, isto é, a seqüência de DNA particular do cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e deve ter sido introduzida na célula hospedeira ou um ancestral da célula hospedeira por evento de trans-
10 formação. A expressão da seqüência de nucleotídeos no cassete de expressão pode estar sob o controle de um promotor constitutivo ou de um promotor induzível que inicia a transcrição somente quando a célula hospedeira é exposta a algum estímulo externo. No caso de um organismo multicelular, tal como planta, o promotor pode ser também específico para um tecido particu-
15 lar ou órgão ou estágio de desenvolvimento.

Gene: o termo "gene" é usado amplamente com referência a qualquer segmento de DNA associado a uma função biológica. Assim, genes incluem seqüências de codificação e/ou seqüências reguladoras exigidas para sua expressão. Os genes incluem também segmentos de DNA não ex-
20 pressos que, por exemplo, formam seqüências de reconhecimento para outras proteínas. Os genes podem ser obtidos de uma variedade de fontes, incluindo clonagem de uma fonte de interesse ou sintetização de uma informação de seqüência conhecida ou predita, e pode incluir seqüências desenhadas para terem parâmetros desejados.

25 Heterólogo/exógeno: Os termos "heterólogos" e "exógenos", quando usados aqui, referem-se a uma seqüência de ácidos nucléicos (por exemplo, uma seqüência de DNA) ou um gene, referem-se a uma seqüência que se origina de uma fonte estranha à célula hospedeira particular ou, se da mesma fonte, é modificada de sua forma original. Assim, um gene heteró-
30 logo em uma célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira particular, mas tem sido modificado através de, por exemplo, o uso de DNA misturado. Os termos podem incluir também cópias múltiplas

que não ocorrem naturalmente de uma seqüência de DNA que ocorre naturalmente. Assim, os termos referem-se a um segmento de DNA que é estranho ou heterólogo à célula, ou homólogo às células, mas em uma posição dentro do ácido nucléico da célula hospedeira e onde o elemento não é comumente encontrado. Segmentos de DNA exógeno são expressos para produzir polipeptídeos exógenos.

Uma seqüência de ácidos nucléicos "homóloga" (por exemplo, DNA) é uma seqüência de ácidos nucléicos (por exemplo, DNA) naturalmente associada a uma célula hospedeira na qual ela é introduzida.

10 Hibridização: A fase "hibridizar especificamente para" refere-se à ligação, duplexação, ou hibridização de uma molécula somente para uma seqüência de nucleotídeos particular sob condições severas quando essa seqüência está presente em um DNA ou RNA de mistura complexa (por exemplo, célula total). "Ligação(ções) substancialmente" refere-se à hibridização complementar entre um ácido nucléico de sonda e um ácido nucléico
15 alvo e engloba combinações que podem ser acomodadas por redução da severidade dos meios de hibridização para obter a detecção desejada da seqüência de ácidos nucléicos alvo.

 Inibidor: uma substância química que inativa a atividade enzimática de uma proteína tal como enzima biossintética, receptor, proteína de transdução de sinal, produto gênico estrutural, ou proteína de transporte. O termo "herbicida" (ou "composto herbicida") é usado aqui para definir um inibidor aplicado a uma planta em qualquer estágio de desenvolvimento, por meio de que o herbicida inibe o crescimento da planta ou mata a planta.

25 Interação: qualidade ou estado de ação mútua de modo que a eficácia ou toxidez de uma proteína ou composto em uma outra proteína seja inibidora (antagonistas) ou intensificadora (agonistas).

 Uma seqüência de ácidos nucléicos é "isocodificadora com" uma seqüência de ácidos nucléicos de referência quando a seqüência de ácidos nucléicos codifica um polipeptídeo tendo a mesma seqüência de aminoácidos que o polipeptídeo codificado pela seqüência de ácidos nucléicos de referência.

30

Isogênico: plantas que são geneticamente idênticas, exceto pelo fato de que elas podem diferir pela presença ou ausência de uma sequência de DNA heteróloga.

5 Isolado: no contexto da presente invenção, uma molécula de DNA isolada ou uma enzima isolada é uma molécula de DNA ou enzima que, pela mão do homem, existe separada de seu ambiente nativo e não é, portanto, um produto da natureza. Uma molécula de DNA ou enzima isolada pode existir em uma forma purificada ou pode existir em um ambiente não-nativo, tal como, por exemplo, em uma célula hospedeira transgênica.

10 Proteína madura: proteína da qual o peptídeo de trânsito, peptídeo de sinal, e/ou porções de propeptídeo foram removidos.

Promotor mínimo da menor peça de um promotor, tal como um elemento TATA, que pode suportar qualquer transcrição. Um promotor mínimo tem tipicamente atividade de promotor, altamente reduzida, em ausência de ativação a montante. Em presença de um fator de transcrição adequado, o promotor mínimo funciona para permitir transcrição.

15 Atividade de enzima modificada: atividade enzimática diferente daquela que ocorre naturalmente em uma planta (isto é, atividade enzimática que ocorre naturalmente na ausência de manipulação direta ou indireta de tal atividade pelo homem), que é tolerante a inibidores que inibem a atividade enzimática que ocorre naturalmente.

Nativo: refere-se a um gene presente no genoma de uma célula de planta não-transformada.

25 Ocorrência natural: o termo "ocorrência natural" é usado para descrever um objeto que pode ser encontrado na natureza como distinto de ser artificialmente produzido pelo homem. Por exemplo, é de ocorrência natural uma proteína ou sequência de nucleotídeos presente em um organismo (incluindo um vírus), que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório.

30 Ácido nucléico: o termo "ácido nucléico" refere-se a desorribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros destes tanto na forma de filamento simples como de filamento duplo. A menos que especificamente limita, o

termo engloba ácidos nucléicos contendo análogos conhecidos de nucleotídeos naturais, que têm propriedades de ligação similares ao ácido nucléico de referência e são metabolizados de um modo similar aos nucleotídeos de ocorrência natural. A menos que de outro modo indicado, uma seqüência de ácidos nucléicos, particular, também engloba implicitamente suas variantes modificadas conservativamente (por exemplo, substituições de códon degenerado) e seqüências complementares e bem como na seqüência explicitamente indicada. Especificamente, substituições de códons degenerados podem ser obtidas por geração de seqüências, nas quais a terceira posição de um ou mais (ou todos) códons selecionados é substituída com resíduos de bases mistas e/ou de desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Os termos "ácido nucléico" ou "seqüências de ácidos nucléicos" podem ser também usados intercambiavelmente com gene, cDNA, e mRNA codificado por um gene.

"ORF" significa quadro aberto de leitura.

Identidade percentual: as frases "porcentagem idêntica" ou "porcentagem idêntica" no contexto de duas seqüências de ácidos nucléicos ou proteínas, referem-se preferivelmente a duas ou mais seqüências ou subseqüências que têm, por exemplo, 60%, preferivelmente, 70%, mais preferivelmente 80%, ainda mais preferivelmente 90%, mesmo mais preferivelmente 95%, e de maior preferência pelo menos 99% de identidade de resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos, quando comparadas ou alinhadas para correspondência máxima, conforme medição usando um dos seguintes algoritmos de comparação de seqüência ou inspeção visual. Preferivelmente, a identidade em porcentagem existe ao longo de uma região das seqüências que tem pelo menos cerca de 50 resíduos de comprimento, mais preferivelmente ao longo uma região de pelo menos cerca de 100 resíduos, e mais preferivelmente a identidade em porcentagem existe ao longo de pelo menos 150 resíduos. Em uma modalidade especialmente preferida, a presente identidade existe ao longo de todo o comprimento das regiões de codificação.

Para comparação de seqüências, tipicamente uma seqüência

age como uma seqüência de referência com a qual seqüências de teste são comparadas. Quando se usa um algoritmo de comparação de seqüências, as seqüências de teste e de referência são inseridas em um computador, as coordenadas de subsequências são designadas se necessário, e os parâmetros do programa de algoritmo de seqüência são designados. O algoritmo de comparação de seqüências calcula então a identidade de porcentagem de seqüência para a(s) seqüência(s) de teste com a seqüência de referência, com base nos parâmetros de programa designados.

O alinhamento ótimo de seqüências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), pela busca por método de similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Pacote de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, Wis.), ou por inspeção visual (vide genericamente, Ausubel et al., abaixo).

Exemplo de um algoritmo que é adequado para determinar a identidade de seqüências em porcentagem e similaridade de seqüências é o algoritmo BLAST, que é descrito por Altschul et al, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Software para realizar a análise de BLAST está publicamente disponível no National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esse algoritmo envolve os primeiros pares de seqüências de classificação alta de identificação (HSPs) por identificação de palavras curtas de comprimento W na seqüência de questões, que ou correspondem ou satisfazem alguma classificação T de limite com valor positivo quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento em uma seqüência da base de dados. T é referido como o limite de classificação de palavras da vizinhança (Altschul et al., 1990). Esses acertos de palavras na vizinhança iniciais agem como sementes para iniciar buscas para encontrar HSPs mais longas contendo estas. Os acertos de palavras são então estendidos em ambas as direções ao longo de cada seqüência para a classifica-

ção até a classificação de alinhamento cumulativo poder ser aumentada. Classificações cumulativas são calculadas usando, por exemplo, para seqüências de nucleotídeos, os parâmetros M (classificação de recompensa para um par de resíduos correspondentes; sempre >0) e N (classificação de penalidade para resíduos que combinam; sempre <0). Para seqüências de aminoácidos, uma matriz de classificação é usada para calcular a classificação cumulativa. Extensão dos acertos de palavras em cada direção é interrompida, quando o alinhamento cumulativo cai da quantidade X de seu valor máximo conseguido, a classificação cumulativa vai para zero ou abaixo devido à acumulação de um ou mais alinhamentos de resíduos de classificação negativa, ou o final de qualquer das seqüências é atingido. Os parâmetros de algoritmo BLAST W, T, e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para seqüências de nucleotídeos) usa padrões de comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um corte de 100, $M=5$, $N=4$, e uma comparação de ambos os filamentos. Para seqüências de aminoácidos, o programa BLASTP usado como padrões um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10 e a matriz de classificação BLOSUM62 (vide Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 10915 (1989)).

Além de calcular a identidade de seqüência em porcentagem, o algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas seqüências (vide, por exemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Uma medição de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma ($P(N)$), que proporciona uma indicação da probabilidade pela qual uma correspondência entre duas seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos ocorreria por acaso. Por exemplo, uma seqüência de ácidos nucléicos de teste é considerada similar a uma seqüência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação da seqüência de ácidos nucléicos com a seqüência de ácidos nucléicos de referência for menor que cerca de 0,1, mais preferivelmente menor que cerca de 0,01, e de maior preferência menor que cerca de 0,001.

Pré-proteína: proteína que é normalmente marcada para uma organela celular, tal como um cloroplasto, e ainda compreende seu peptídeo de trânsito nativo.

Purificado: o termo "purificado", quando aplicado a um ácido nucléico ou proteína, denota que o ácido nucléico ou a proteína está essencialmente isenta de outros componentes celulares com os quais ele(ela) é associado(a) no estado natural. Está preferivelmente em um estado homogêneo embora possa estar em uma solução seca ou aquosa. Pureza e homogeneidades são tipicamente determinadas usando técnicas de química analítica tais como eletroforese de gel de poliacrilamida ou cromatografia líquida de alto desempenho. Uma proteína que é a espécie predominante em uma preparação está substancialmente purificada. O termo "purificado" denota que um ácido nucléico ou proteína gera essencialmente uma banda em um gel eletroforético. Particularmente, isso significa que o ácido nucléico ou a proteína é pelo menos cerca de 50% pura, mais preferivelmente cerca de pelo menos 85% pura, e de maior preferência pelo menos cerca de 99% pura.

Dois ácidos nucléicos são "recombinados" quando seqüências de cada um dos dois ácidos nucléicos são combinadas em um ácido nucléico progênie. Duas seqüências são "diretamente" recombinadas quando ambos os ácidos nucléicos são substratos para recombinação. Duas seqüências são "recombinadas indiretamente" quando as seqüências são recombinadas usando um intermediário tal como um oligonucleotídeo de permuta. Para recombinação indireta, não mais que uma das seqüências é um substrato real para recombinação, e em alguns casos, nenhuma seqüência é um substrato para recombinação.

"Elementos reguladores" referem-se às seqüências envolvidas no controle da expressão de uma seqüência de nucleotídeos. Elementos reguladores compreendem um promotor operativamente ligado à seqüência de nucleotídeos de interesse e sinais de terminação. Eles também englobam tipicamente seqüências requeridas para tradução da seqüência de nucleotídeos.

Aumento significativo: um aumento significativo na atividade enzimática que é maior que a margem de erro na técnica de medição, preferivelmente um aumento de cerca de 2 vezes ou mais da atividade do tipo de enzima do tipo selvagem em presença do inibidor, mais preferivelmente um aumento de cerca de 5 vezes ou mais, e de maior preferência um aumento de cerca de 10 vezes ou mais.

Significativamente menor: significa que a quantidade de um produto de uma reação enzimática é reduzida de maior que a margem de erro inerente à técnica de medição, preferivelmente um decréscimo de cerca de 2 vezes ou mais da atividade da enzima do tipo selvagem em ausência do inibidor, mais preferivelmente um decréscimo de cerca de 5 vezes ou maior, e de maior preferência um decréscimo de cerca de 10 vezes ou maior.

Ligação específica/Reatividade Cruzada Imunológica: uma indicação de que duas seqüências de ácidos nucleicos ou de proteínas são substancialmente idênticas é que a proteína codificada pelo primeiro ácido nucleico apresenta reatividade imunologicamente cruzada com ou se liga especificamente à proteína codificada pelo segundo ácido nucleico. Assim, uma proteína é típica e substancialmente idêntica a uma segunda proteína, por exemplo, se as duas proteínas diferirem somente por substituições conservadoras. A frase "especificamente (ou seletivamente) se liga a um anticorpo", ou "especificamente (ou seletivamente) imunorreativo com", quando com referência a uma proteína ou peptídeo, refere-se a uma reação de ligação que é determinante da presença da proteína em presença de uma população heterogênea de proteínas e outras substâncias biológicas. Assim, sob condições de imunoensaio designadas, os anticorpos especificados se ligam a uma proteína particular e não se ligam em uma quantidade significativa às outras proteínas presentes na amostra. Ligação específica para um anticorpo sob tais condições pode requerer um anticorpo que é selecionado quanto a sua especificidade para uma particular proteína. Por exemplo, anticorpos gerados para a proteína com a seqüência de aminoácidos codificada por quaisquer das seqüências de aminoácidos da invenção podem ser selecionados para obter anticorpos especificamente imunorreativos com aquela

proteína e não com outras proteínas exceto para variantes polimórficas. Uma variedade de formatos de imunoensaio pode ser usada para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos com uma proteína particular. Por exemplo, imunoensaios ELISA em fase sólida, Western blots, ou imunoisto-
5 química são rotineiramente usados para selecionar anticorpos monoclonais especificamente imunorreativos com uma proteína. Vide Harlow e Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nova Iorque ("Harlow and Lane"), para descrição de formatos de imunoensaios e condições que podem ser usadas para determinar imunorreatividade
10 específica. Tipicamente, uma reação específica ou seletiva é de pelo menos duas vezes o sinal de procedência ou de ruído e mais tipicamente acima de 10 a 100 vezes de procedência.

"Condições de hibridização severas" e "condições de lavagem de hibridização severas" no contexto dos experimentos de hibridização de
15 ácidos nucleicos tais como hibridizações Southern e Northern são dependentes de sequência, e são diferentes sob parâmetros ambientais diferentes. Sequências mais longas hibridizam especificamente em temperaturas mais altas. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é dado por Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Bio-*
20 *logy-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nova Iorque. Geralmente, condições de hibridização e de lavagem severas são selecionadas para serem de 5°C inferiores ao ponto de fusão térmico (T_m) para a sequência específica em uma resistência iônica e pH
25 definidos. Tipicamente, sob "condições severas" uma sonda hibridizará para sua subsequência-alvo, mas não para outras sequências.

A T_m é a temperatura (sob resistência iônica e pH definidos) em cujos 50% da sequência-alvo hibridiza para uma sonda perfeitamente correspondida. Condições muito severas são selecionadas para serem iguais à
30 T_m para uma sonda particular. Um exemplo de condições de hibridização severas para hibridização de ácidos nucleicos complementares, que têm mais que 100 resíduos complementares em um filtro em um Southern ou

Northern blot é 50% de formamida com 1 mg de heparina, a 42°C, com a hibridização sendo efetuada durante a noite. Um exemplo de condições de lavagem altamente severas é NaCl a 0,15M a 72°C, por cerca de 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem severas é 0,2 vez SSC a 65°C, por 15 minutos (vide, Sambrook, abaixo, para uma descrição de tampão de SSC). Frequentemente, lavagem de alta severidade é precedida de uma lavagem de baixa severidade para remover sinal de sonda de procedência. Um exemplo de lavagem de severidade média para um duplex de, por exemplo, mais que 100 nucleotídeos, 1 vez de SSC a 45°C, por 15 minutos.

Um exemplo de lavagem de baixa severidade para um duplex de, por exemplo, mais que 100 nucleotídeos, é de 4 a 6 vezes de SSC, a 40°C, por 15 minutos. Para sondas curtas (por exemplo, cerca de 10 a 50 nucleotídeos), condições severas envolvem tipicamente concentrações de sal de menos que cerca de íon de Na a 0,1M, tipicamente cerca de 0,01 a 1,0M de concentração de íon Na (ou outros sais), em pH 7,0 a 8,3, e a temperatura é tipicamente pelo menos cerca de 30°C. Condições severas podem ser também obtidas com a adição de agentes desestabilizantes tal como formamida. Em geral, uma razão de sinal para ruído de 2 vezes (ou mais) que aquela observada para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridização particular indica detecção de uma hibridização específica. Ácidos nucleicos que não hibridizam para quaisquer outras condições severas são ainda substancialmente idênticos se as proteínas que eles codificam forem substancialmente idênticas. Isso ocorre, por exemplo, quando uma cópia é criada usando a degenerescência máxima de códon permitida pelo código genético.

Os seguintes são exemplos de condições de hibridização/lavagem que podem ser usadas para clonar seqüências de nucleotídeos que são homólogos das seqüências de nucleotídeos de referência da presente invenção: uma seqüência de nucleotídeos de referência hibridiza preferivelmente para a seqüência de nucleotídeos de referência em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO₄ a 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 2 vezes de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, mais desejavelmente em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO₄ a 0,5M, EDTA 1Mm, a 50°C, com lava-

- gem em 1 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, mais desejavelmente em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 0,5 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, preferivelmente em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO₄ a 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 0,1 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 50°C, mais preferivelmente em dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), NaPO₄ a 0,5M, EDTA 1mM, a 50°C, com lavagem em 0,1 vez de SSC, SDS a 0,1%, a 65°C.

- "Subseqüência" refere-se a uma seqüência de ácidos nucléicos ou de aminoácidos que compreende uma parte de uma seqüência mais longa de ácidos nucléicos ou de aminoácidos (por exemplo, proteína), respectivamente.

- Substrato: um substrato é a molécula que uma enzima reconhece naturalmente e converte em um produto na via bioquímica na qual a enzima efetua naturalmente a sua função, ou é uma versão modificada da molécula, que é também reconhecida pela enzima e é convertida pela enzima em um produto, em uma reação enzimática similar à reação que ocorre naturalmente.

- Transformação: um processo para introduzir DNA heterólogo em uma célula de planta, um tecido de planta, ou planta. Células de planta, tecido de planta ou plantas transformadas devem ser entendidas como englobando não somente o produto final de um processo de transformação, mas também sua progênie transgênica.

- "Transformado", "transgênico" e "recombinante" referem-se a um organismo hospedeiro tal como bactéria ou planta onde uma molécula de ácido nucléico heterólogo tenha sido introduzida. A molécula de ácido nucléico pode estar estavelmente integrada no genoma do hospedeiro ou a molécula de ácido nucléico pode estar também presente como uma molécula extracromossomial. Tal molécula extracromossomial pode ser autorreplicadora. Células, tecidos e plantas transformados devem ser entendidos como englobando não somente o produto final de um processo de transformação, mas também a progênie deste. Um hospedeiro "não-transformado", "não-transgênico", ou "não-recombinante" refere-se a um organismo do tipo

selvagem, por exemplo, uma bactéria ou planta, que não contém a molécula de ácido nucléico heterólogo.

Viabilidade: "viabilidade", como usada aqui, significa um parâmetro de ajuste de uma planta. As plantas são ensaiadas para seu desempenho homozigoto do desenvolvimento da planta, indicando que as plantas são
5 essenciais para o crescimento da planta.

Alteração da expressão de uma seqüência de nucleotídeos de presente invenção é também obtida por interferência de dsRNA conforme descrição no WO 99/32619, WO 99/53050 ou WO 99/61631, todos aqui in-
10 corporados a título de referência em sua totalidade. Em uma outra modalidade, a alteração da expressão de uma seqüência de nucleotídeos da presente invenção, preferivelmente a redução de sua expressão, é obtida por interferência de RNA de filamento duplo (dsRNA). A totalidade ou, preferi-
15 venção está compreendida em uma molécula de DNA. O tamanho da molécula de DNA é preferivelmente de 100 a 1.000 nucleotídeos ou mais; o tamanho ótimo a ser determinado empiricamente. Duas cópias da molécula de DNA idênticas são ligadas, separadas por uma molécula de DNA espaçador, de modo que a primeira e a segunda cópias estejam em orientações opo-
20 tas. Na modalidade preferida, a primeira cópia de molécula de DNA está no complemento reverso (também conhecido como filamento de não-codificação) e a segunda cópia é o filamento de codificação; na modalidade mais preferida, a primeira cópia é o filamento de codificação, e a segunda cópia é o complemento reverso. O tamanho da molécula de DNA espaçador
25 é preferivelmente de 200 a 10.000 nucleotídeos, mais preferivelmente 400 a 5.000 nucleotídeos e de maior preferência de 600 a 1.500 nucleotídeos de comprimento. O espaçador é preferivelmente uma peça aleatória de DNA, mais preferivelmente uma peça aleatória de DNA com homologia para o organismo-alvo para a interferência de dsRNA, e de maior preferência um ín-
30 tron funcional que é efetivamente unido pelo organismo alvo. As duas cópias da molécula de DNA separadas pelo espaçador são operativamente ligadas a um promotor funcional em uma célula de planta, e introduzidas em uma

célula de planta, onde a seqüência de nucleotídeos é expressável. Em uma modalidade preferida, a molécula de DNA que compreende a seqüência de nucleotídeos, ou uma porção desta, é estavelmente integrada ao genoma da célula de planta.

5 Em uma outra modalidade preferida, a molécula de DNA compreendendo a seqüência de nucleotídeos, ou uma porção desta, está compreendida em uma molécula de replicação extracromossomial. Várias publicações que descrevem essa abordagem são citadas para posterior ilustração (Waterhouse et al. (1998) PNAS 95:13959-13964; Chuang e Meyerowitz
10 (2000) PNAS 97:49854990; Smith et al. (2000) Nature 40:319-320). A alteração da expressão de uma seqüência de nucleotídeos por interferência de dsRNA está também descrita em, por exemplo, WO 99/32619, WO 99/53050 ou WO 99/61631, todas estas aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade.

15 Nas plantas transgênicas que contêm uma das moléculas de DNA descritas imediatamente acima, a expressão da seqüência de nucleotídeos correspondente à seqüência de nucleotídeos compreendida na molécula de DNA é preferivelmente reduzida. Preferivelmente, a seqüência de nucleotídeos na molécula de DNA é pelo menos 70% idêntica à seqüência de
20 nucleotídeos, cuja expressão é reduzida, mais preferivelmente ela é pelo menos 80% idêntica, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% idêntica, ainda de maior preferência pelo menos 95% idêntica, de ainda maior preferência pelo menos 99% idêntica.

Controle de Expressão de Gene em Plantas Transgênicas

25 A invenção refere-se ainda às células transformadas que compreendem as moléculas de ácido nucléico, plantas transformadas, sementes, e partes de plantas, e métodos para modificar as características fenotípicas de interesse por alteração da expressão dos genes da invenção.

A. Modificação das Seqüências de Codificação e Seqüências Adjacentes

30 A expressão transgênica em plantas de genes derivados de fontes heterólogas pode envolver a modificação daqueles genes para obter e otimizar sua expressão em plantas. Em particular, ORFs bacterianos que

codificam enzimas separadas, mas que são codificados pelo mesmo transcrito no micróbio nativo, são mais bem expressos em plantas em transcritos separados. Para obtenção disto, cada ORF microbiano é isolado individualmente e clonado dentro de um cassete que proporciona uma seqüência de promotores de planta na extremidade 5' do ORF e um terminador transcripcional de planta na extremidade 3' do ORF. A seqüência de ORFs isolada inclui preferivelmente o códon ATG iniciador e o códon STOP terminador, mas pode incluir seqüência adicional além do códon ATG iniciador e do STOP. Além disso, o ORF pode estar truncado, mas ainda retém a atividade requerida; para ORFs longos, versões truncadas que retêm atividade podem ser preferíveis para expressão em organismos transgênicos. "Promotor de planta" e "terminador transcripcional de planta" significam promotores e terminadores transcripcionais que operam dentro das células de planta. Isso inclui promotores e terminadores de transcrição que podem ser derivados de fontes não-plantas tais como vírus (um exemplo é o Vírus Mosaico da Couve-Flor).

Em alguns casos, a modificação das seqüências de codificação de ORF e da seqüência adjacente não é requerida. É suficiente isolar um fragmento contendo o ORF de interesse e inseri-lo a jusante de um promotor de planta. Por exemplo, Gaffney et al. (Science 261: 754-756 (1993)) expressaram o gene nahG de *Pseudomonas* em plantas transgênicas sob o controle do promotor CaMV 35S e o terminador CaMV tml com sucesso sem modificação da seqüência de codificação e com nucleotídeos de gene de *Pseudomonas* a montante do ATG ainda ligado, e nucleotídeo a jusante do códon STOP ainda ligado ao ORF de nahG. Preferivelmente, uma pequena seqüência microbiana adjacente deve ser deixada a montante do ATG e a jusante do códon STOP. Na prática, tal construção pode depender da disponibilidade de sítios de restrição.

Em outros casos, a expressão de genes derivados de fontes microbianas pode proporcionar problemas na expressão. Esses problemas foram bem caracterizados na técnica e são particularmente comuns com genes derivados de certas fontes como *Bacilos*. Esses problemas podem se

aplicar à seqüência de nucleotídeos desta invenção, e a modificação desses genes pode ser efetuada por técnicas agora bem-conhecidas na arte. Os seguintes problemas podem ser encontrados:

1. Uso de Códon.

5 O uso de códon preferido em plantas difere do uso de códon preferido em certos microorganismos. Comparação do uso de códons dentro de um ORF microbiano clonado com o uso em genes de plantas (e em particular genes da planta alvo) possibilitará uma identificação dos códons dentro do ORF, que seria preferivelmente alterado. Tipicamente, a evolução da
10 planta tende a uma forte preferência dos nucleotídeos C e G na terceira posição de base de monocotiledôneas, ao passo que as dicotiledôneas frequentemente usam os nucleotídeos A ou T nesta posição. Com a modificação de um gene para incorporar uso de códon preferido para uma espécie transgênica alvo particular, muitos dos problemas descritos abaixo relativos
15 ao teor de GC/AT e junção ilegítima serão superados.

2. Teor de GC/AT

 Genes de plantas têm tipicamente um teor de GC de mais que 35%. As seqüências de ORFs que são ricas em nucleotídeos A e T podem causar vários problemas nas plantas. Em primeiro lugar, acredita-se que mo-
20 tivos de ATTTA provocam a desestabilização das mensagens e são encontrados na extremidade 3' de muitos mRNAs de vida curta. Em segundo lugar, acredita-se que a ocorrência de sinais de poliadenilação tal como AA-TAAA em posições inapropriadas dentro da mensagem causa truncação prematura de transcrição. Além disso, monocotiledôneas podem reconhecer
25 seqüências ricas em AT em sítios de junção (vide abaixo).

3. Seqüências Adjacentes à Metionina de Iniciação

 As plantas diferem dos microorganismos em que suas mensagens não possuem um sítio de ligação de ribossomo definido. Mais exatamente, acredita-se que ribossomos se liguem à extremidade 5' da mensagem e faça uma varredura para o primeiro ATG disponível, no qual a trans-
30 lação começa. Contudo, acredita-se que existe uma preferência por certos nucleotídeos adjacentes ao ATG e que a expressão de genes microbianos

pode ser intensificada pela inclusão de um iniciador de tradução de consenso eucariótico no ATG. Clontech (catálogo de 1993/1994, página 210, aqui incorporado a título de referência) sugeriu uma seqüência como um iniciador de tradução de consenso para a expressão do gene uidA da *E. coli* em plantas. Ainda, Joshi (N.A.R. 15: 6643-6653 (1987), incorporado aqui a título de referência) comparou muitas seqüências de plantas com o ATG e sugere uma outra seqüência de consenso. Em situações onde dificuldades são encontradas na expressão dos ORFs microbianos em plantas, a inclusão de uma dessas seqüências no ATG de iniciação podem aperfeiçoar a tradução.

Em tais casos, os últimos três nucleotídeos do consenso podem não ser apropriados para inclusão na seqüência modificada devido à sua modificação do segundo resíduo AA. Seqüências preferidas adjacentes à metionina de iniciação podem diferir entre espécies de plantas diferentes. Uma investigação em 14 genes de milho localizados no banco de dados GenBank forneceram os resultados:

1 Posição Antes do ATG de Iniciação em 14 Genes de Milho:

-10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 C 3 8 4 6 2 5 6 0 10 T 3 0 3 4 3 2 1 1 1 0 A 2 3 1
4 3 2 3 7 2 3 G 6 3 6 0 6 5 4 6 1 5

Essa análise pode ser efetuada para as espécies de plantas desejadas, nas quais a seqüência de nucleotídeos está sendo incorporada, e a seqüência adjacente ao ATG modificado para incorporar os nucleotídeos preferidos.

4. Remoção de Sítios de Junção Ilegítima

Genes clonados de fontes não-planta e não otimizados para expressão em plantas podem conter também motivos que podem ser reconhecidos nas plantas como sítios de junção 5' ou 3', e ser clivados, gerando, assim, mensagens truncadas ou deletadas. Esses sítios podem ser removidos usando-se técnicas bem-conhecidas na arte.

Técnicas para a modificação de seqüências de codificação e seqüências adjacentes são bem-conhecidas na arte. Nos casos em que a expressão inicial de um ORF microbiano é baixa e é considerada apropriada para fazer alterações na seqüência conforme descrito acima, então a cons-

trução de genes sintéticos pode ser obtida de acordo com os métodos bem-conhecidos na técnica. Esses são, por exemplo, descritos nas descrições de patentes publicadas EP 0 385 962 (Monsanto), EP 0 359 472 (Lubrizol) e WO 93/07278 (Ciba-Geigy), todas as quais são aqui incorporadas a título de referência. Na maioria dos casos, é preferível ensaiar a expressão de construções de gene usando protocolos de ensaios transitórios (que são bem-conhecidos na técnica) antes de sua transferência para as plantas transgênicas.

B. Construção de Cassetes de Expressão de Plantas

Sequências de codificação destinadas à expressão em plantas transgênicas são inicialmente montadas em cassetes de expressão atrás de um promotor adequado expressável em plantas. O cassete de expressão pode compreender também quaisquer sequências adicionais requeridas ou selecionadas para a expressão do transgene. Tais sequências incluem, mas sem restrição, terminadores de transcrição, sequências estranhas para intensificar a expressão tais como íntrons, sequências vitais, e sequências destinadas para a marcação do produto gênico a organelas específicas e compartimentos de células. Esses cassetes de expressão podem ser então facilmente transferidos para os vetores de transformação de plantas descritos abaixo. O seguinte é uma descrição de vários componentes de cassetes de expressão típicos.

1. Promotores

A seleção do promotor usado nos cassetes de expressão determinará o padrão de expressão espacial e temporal do transgene na planta transgênica. Promotores selecionados expressarão transgenes em específicos tipos de células (tais como células epidérmicas de folha, células mesófilas, células do córtex de raiz,) ou em tecidos ou órgãos específicos (raízes, folhas ou flores, por exemplo) e a seleção refletirá a localização desejada do acúmulo do produto gênico. Alternativamente, o promotor selecionado pode conduzir a expressão do gene sob várias condições indutoras. Os promotores variam em sua resistência, isto é, capacidade de promover transcrição. Dependendo do sistema de célula hospedeira utilizado, qualquer um de vá-

rios promotores adequados pode ser usado, incluindo o promotor nativo de gene. Os seguintes são exemplos não-limitativos de promotores que podem ser usados nos cassetes de expressão.

a. Expressão Constitutiva, o Promotor de Ubiquitina:

5 A ubiquitina é um produto gênico conhecido por se acumular em vários tipos de células e seu promotor tem sido clonado de várias espécies para uso em plantas transgênicas (por exemplo, girassol – Binet et al., Plant Science 79: 87-94 (1991); milho – Christensen et al., Plant Molec. Biol. 12: 619-632 (1989); e *Arabidopsis* – Callis et al., J. Biol. Chem. 265: 12486-10 12493 (1990) e Norris et al., Plant Mol. Biol. 21: 895-906 (1993)). O promotor de ubiquitina de milho tem sido desenvolvido em sistemas de monocotiledônea transgênica e sua seqüência e vetores construídos para transformação de monocotiledôneas são descritos na Patente EP 0 342 926 (Lubrizol), que é aqui incorporada a título de referência. Taylor et al. (Plant Cell Rep. 12: 15 491495 (1993)) descrevem um vetor (pAHC25) que compreende um promotor de ubiquitina de milho e primeiro íntron e sua alta atividade em suspensões de células de várias monocotiledôneas, quando introduzido via bombardeio de microprojéteis. O promotor de ubiquitina de *Arabidopsis* é ideal para uso com as seqüências de nucleotídeos da presente invenção. O 20 promotor de ubiquitina é adequado para expressão de gene em plantas transgênicas, tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas. Vetores adequados são derivados de pAHC25 ou quaisquer dos vetores de transformação descritos neste pedido, modificados pela introdução do promotor de ubiquitina apropriado e/ou seqüências de íntrons.

25 b. Expressão Constitutiva, o Promotor CaMV 35S:

 Construção do plasmídio pCGN1761 é descrita no pedido de patente EP 0 392 225 (Exemplo 23), que é aqui incorporado a título de referência. pCGN1761 contém o promotor CAMV 35 S "duplo" e o terminador transcricional tml com um sítio EcoRI único entre o promotor e o terminador 30 e tem a estrutura principal do tipo pUC. Um derivado de pCGN1761 é construído tendo um poliligante modificado que inclui sítios NotI e XhoI, além do sítio EcoRI, existente. Esse derivado é designado pCGN1761ENX.

pCGN1761ENX é útil para clonar seqüências de cDNA ou seqüências de codificação (incluindo seqüências de ORFs microbianos) dentro de seu poliligante com a finalidade de sua expressão sob o controle do promotor 35S em plantas transgênicas. O cassete inteiro de promotor 35S-seqüência de codificação-terminador tml de tal construção pode ser excisado pelos sítios 5' HindIII, SphI, Sall, e XbaI para o promotor e sítios 3' XbaI, BamHI e BglII) para o terminador para transferência para vetores de transformação tais como aqueles descritos abaixo. Além disso, o fragmento de promotor 35S duplo pode ser removido por excisão 5' com HindIII, SphI, Sall, XbaI, ou PstI, e excisão 3' com quaisquer sítios de restrição de poliligante (EcoRI, NotI ou XhoI) para substituição com um outro promotor. Se desejado, modificações em torno dos sítios de clonagem podem ser feitas pela introdução de seqüências que podem intensificar a tradução. Isso é particularmente útil quando a superexpressão é desejada. Por exemplo, pCGN1761ENX pode ser modificado por otimização do sítio de iniciação traducional como descrito no Exemplo 37 da Patente US5.639.949, aqui incorporada a título de referência.

c. Expressão Constitutiva, o Promotor de Actina:

Várias isoformas de actina são conhecidas por expressarem na maioria dos tipos de células e, conseqüentemente, o promotor de actina é uma boa escolha para um promotor constitutivo. Em particular, o promotor proveniente do gene Act1 de arroz foi clonado e caracterizado (McElroy et al., Plant Cell 2: 163-171 (1990)). Verificou-se que um fragmento de 1,3 kb do promotor continha todos os elementos reguladores requeridos para expressão em protoplastos de arroz. Além disso, numerosos vetores de expressão de arroz com base no promotor Act1 têm sido construídos especificamente para uso em monocotiledôneas (McElroy et al., Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)). Esses incorporam o Act1-íntron 1, seqüência flanqueadora 5' de Adhl e Adhl-íntron 1 (do gene de álcool de milho desidrogenase) e seqüência do promotor CaMV 35S. Os vetores mostrando a maior expressão foram as fusões de 35S e Act1 íntron ou a seqüência flanqueadora 5' de Act1 íntron e o Act1 íntron. Otimização das seqüências em torno do ATG iniciador (do gene

repórter GUS) também intensificou a expressão. Os cassetes de expressão de promotor descritos por McElroy et al. (Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)) podem ser facilmente modificados para expressão de genes e são particularmente adequados para uso em hospedeiros de monocotiledônea.

- 5 Por exemplo, fragmentos contendo promotor são removidos das construções de McElroy e usados para repor o promotor 35S duplo em pCGN1761ENX, que é então disponível para a inserção de seqüências de genes específicos. Os genes de fusão assim construídos podem ser então transferidos para vetores de transformação apropriados. Em um relatório separado, foi constatado que o promotor de Act1 com seu primeiro íntron direciona alta expressão em células de cevada cultivadas (Chibbar et al., Plant Cell Rep. 12: 506-509 (1993)).

d. Expressão Induzível, Promotores PR-1:

- O promotor 35S duplo em pCGN1761ENX pode ser substituído com qualquer outro promotor de escolha que resultará em níveis de expressão adequadamente altos. A título de exemplo, um dos promotores quimicamente reguláveis descritos na Patente US Nº 5.614.395, tal como o promotor PR-1 de tabaco, pode substituir o promotor 35S duplo. Alternativamente, o promotor PR-1 de *Arabidopsis* descrito por Lebel et al., Plant J. 16: 223-233 (1998) pode ser usado. O promotor de escolha é preferivelmente excisado de sua fonte por enzimas de restrição, mas pode ser alternativamente amplificado por PCR usando iniciadores que contêm sítios de restrição terminal, apropriados. Se a amplificação de PCR for efetuada, então o promotor deve ser resseqüenciado para checagem de erros de amplificação depois da clonagem do promotor amplificado no vetor-alvo. O promotor PR-1a regulável quimicamente ou por patógeno é clivado do plasmídio pCIB1004 (para construção, vide Exemplo 21 da EP 0332 104, que é aqui incorporada a título de referência) e transferido para o plasmídio pCGN1761ENX (Uknes et al., Plant Cell 4: 645-656 (1992)). pCIB1004 é clivado com NcoI e o resultante 3' projetando-se do fragmento linearizado é tornado cego por tratamento com T4 DNA polimerase. O fragmento é então clivado com HindIII e o fragmento contendo o promotor PR-1a, resultante, é

purificado em gel e clonado para pCGN1761ENX, do qual o promotor 35S duplo foi removido. Isso é feito por clivagem com XhoI e tornado cego com T4 polimerase, seguido por clivagem com HindIII e isolamento do fragmento contendo terminador de vetor maior no qual o fragmento de promotor pCIB1004 é clonado. Isso gera um derivado de pCGN1761ENX com o promotor PR-1a e o terminador tml e um poliligante intermédio com sítios únicos EcoRI e NotI. A sequência de codificação selecionada pode ser inserida nesse vetor, e os produtos de fusão (isto é, promotor-gene-terminador) podem ser subsequentemente transferidos para qualquer vetor de transformação selecionado, inclusive aqueles descritos, abaixo. Vários reguladores químicos podem ser empregados para induzir a expressão da sequência de codificação selecionada nas plantas transformadas de acordo com a presente invenção, incluindo o benztiazol, ácido isonicotínico, e compostos de ácido salicílico descritos nas Patentes US Nº 5.523.311 e US 5.614.395.

15 e. Expressão Induzível, um Promotor Induzível por Etanol:

Um promotor induzível por certos álcoois e cetonas, tal como etanol, podem ser também usados para conferir expressão induzível de uma sequência de codificação da presente invenção. Tal promotor é, por exemplo, um promotor de gene alcA de *Aspergillus nidulans* (Caddick et al. (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180). Em *A. nidulans*, o gene alcA codifica álcool desidrogenase 1, cuja expressão é regulada pelos fatores de transcrição AlcR em presença do indutor químico. Para os propósitos da presente invenção, as seqüências de codificação de CAT em plasmídio palcA:CAT compreendendo uma seqüência de promotores de gene alcA fundida a um promotor 35a mínimo (Caddick et al. (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180) são substituídas por uma seqüência de codificação da presente invenção para formar um cassete de expressão tendo a seqüência de codificação sob o controle do promotor de gene alcA. Isso é efetuado usando métodos bem-conhecidos na técnica.

30 f. Expressão Induzível, um Promotor Induzível por Glicocorticóide:

A indução de expressão de uma seqüência de ácidos nucléicos da presente invenção usando sistemas com base em hormônios esteróides

é também contemplada. Por exemplo, um sistema de indução mediado por glicocorticóide é usado (Aoyama e Chua (1997) *The Plant Journal* 11: 605-612) e expressão de gene é induzida por aplicação de um glicocorticóide, por exemplo, um glicocorticóide sintético, preferivelmente dexametasona, preferivelmente em uma concentração que varia de 0,1mM a 1mM, mais preferivelmente de 10mM a 100mM. Para os propósitos da presente invenção, as seqüências de genes de luciferase são substituídas por uma seqüência de ácidos nucleicos da invenção para formar um cassete de expressão tendo uma seqüência de ácidos nucleicos da invenção sob o controle de seis cópias de seqüências ativadoras a montante de GAL4 fundidas ao promotor 35S mínimo. Isso é efetuado usando métodos bem-conhecidos na técnica. O fator de transação compreende o domínio de ligação de DNA GAL4 (Keegan et al. (1986) *Science* 231: 699-704) fundido ao domínio de transativação da proteína viral de herpes VP16 (Triezenberg et al. (1988) *Genes Devel.* 2: 718-729) fundido ao domínio de ligação do receptor de glicocorticóide de rato (Picard et al. (1988) *Cell* 54: 1073-1080). A expressão da proteína de fusão é controlada por qualquer promotor adequado para expressão em plantas conhecido da técnica ou descrito aqui. Esse cassete de expressão é também compreendido na planta compreendendo uma seqüência de ácidos nucleicos da invenção fundida a 6 vezes GAL4/promotor mínimo. Assim, especificidade de tecido ou órgão da proteína de fusão é obtida levando à especificidade de tecido ou órgão induzível da toxina inseticida.

g. Expressão Específica para Raiz

Um outro padrão de expressão de gene é a expressão de raiz. Um promotor para raiz, adequado, é o promotor do gene similar à metalotioneína do milho (MTL) descrito por de Framond (*FEBS* 290: 103-106 (1991)) e também na Patente US Nº 5.466.785, aqui incorporada a título de referência. Esse promotor "MTL" é transferido para um vetor adequado tal como pCGN1761ENX para a inserção de um gene selecionado e transferência subsequente do inteiro cassete de promotor-gene-terminador para um vetor de transformação de interesse.

h. Promotores Induzíveis por Ferimento:

Promotores induzíveis por ferimento podem ser também adequados para expressão de gene. Numerosos de tais promotores têm sido descritos (por exemplo, Xu et al. Plant Molec. Biol. 22: 573-588 (1993), Longemann et al. Plant Cell 1: 151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, Plant Molec. Biol. 22: 783-792 (1993), Firek et al., Plant Molec. Biol: 129-142 (1993), Warner et al., Plant J. 3: 191-201 (1993)) e todos são adequados para uso com a presente invenção. Longeman et al. descrevem as seqüências 5' a montante do gene wunl da batata dicotiledônea. Xu et al. mostram que um promotor induzível de ferimento da batata de dicotiledônea (pin2) é ativo no arroz monocotiledôneo. Ainda, Rohrmeier & Lehle descrevem a clonagem do cDNA Wipl de milho, que é um ferimento induzido e que pode ser usado para isolar o promotor cognato usando técnicas-padrão. Similarmente, Firek et al. e Warner et al. descreveram um gene induzido da *Asparagus officinalis* monocotiledônea, que é expressa no ferimento local e sítios de invasão de patógenos.

Usando técnicas de clonagem bem-conhecidas na técnica, esses promotores podem ser transferidos para vetores adequados, fundidos aos genes pertencentes a esta invenção, e usados para expressar estes genes nos sítios de ferimento da planta.

i. Expressão Preferida da Medula

Pedido de Patente WO 93/07278, que é aqui incorporado a título de referência, descreve o isolamento do gene trpA do milho, que é preferencialmente expresso em células de medula. A seqüência de genes e o promotor se prolongando até -1726 pb do início da transcrição são apresentados. Usando técnicas-padrão de biologia molecular, esse promotor ou partes dele podem ser transferidos para um vetor tal como pCGN1761, onde ele pode repor o promotor 35S e pode ser usado para conduzir a expressão de um gene estranho em um modo preferido para medula. De fato, fragmentos contendo o promotor preferido para medula ou partes dele podem ser transferidos para qualquer reator e modificados para utilidade em plantas transgênicas.

J. Expressão Específica para Folha:

Um gene de milho que codifica fosfoenol carboxilase (PEPC) foi descrito por Hudspeth & Grula (Plant Molec Biol 12: 579-589 (1989)). Usando técnicas-padrão de biologia molecular, o promotor para esse gene pode ser usado para conduzir a expressão de qualquer gene em um modo específico para folha em plantas transgênicas.

k. Expressão Específica para Pólen:

WO 93/07278 descreve o isolamento do gene de proteína quinase depende de cálcio (CDPK) do milho, que é expresso em células de pólen. A sequência de genes e promotor se estendendo até 1.400 pb do início da transcrição. Usando técnicas-padrão de biologia molecular, esse promotor ou partes dele foram transferidos para um vetor tal como pCGN1761, onde ele substitui o promotor 35S e pode ser usado para conduzir a expressão de uma sequência de ácidos nucleicos da invenção em um modo específico para pólen.

l. Expressão Específica para Sabugo:

O promotor OsMADs6, isolado de arroz, é um promotor específico para sabugo de milho, tendo a sequência:

```
ctaggacgatggtgtgatgtggaacacgaagaaacatgaggaaaaatattaaatgaattccacttaaaatgcatca
aataaaaaaaaaaagaacgaccgggaatagacacagggttgtgaactagctagggcaaacatcatatggtcccttgc
gatgcacaagtacattgagatgtcattcaattctgtgcacatcatgcatgtggtcccttgcgaatattactcttgaatatctac
cagtgccaatctattgcatgacttaattaattcacaggtttgtgattacattattagtaagcttgagagcacaagctcaatggat
tttctataaatggggatcattttgcaattttcttctgtcgtgcaaaagttagccttcttattactacttctgttttaaatatcgcctta
ttgacttttggcatatatattaaccatgtatcttattagatgttgcgcaaatatataaccttcaatgataaaattagtacaatga
aacaatgatatttacgcaattcttttactaacaagtcacaagaagtagcctgcagcaatatatgttgaaccgtgcagtagat
cgagcctagctacgcaaaaaacaaaaagagaaaaaaagggaaggaaaaacattaatcatgcatgagcagtagtgcgg
gcaactggaatttgcgaagatatggggagaggagaataatacaagtactactactacctagctctaccatgcatatgcacc
caaaggcaaaactggattattggataaagcacagatgctggcaaaacaatcctaagcctccctccctgcttcttatttttgg
gcagcctctaccggacggtgccgtggtccattggaccagtaggtggcgacatacatggtttgggttaagcttaggagagca
gtgtgtgtgcgcgcgaagagagagagactgtgagctgggagtagccctctccctccttggccatcttctcgtgtatat
gcatatatgcatcatcgcaacggtgtatattgtggtgtggcgggtgtggcattggattgccccatttggctcgtgcttccca
gttagggtaaaacctgtggttaactgtctagccccacgcaaaagtacccttcttattgttgaaggagaggaggtgtgtg
aattgtgatggaggaggagagagagagatagaagagagatgtgtgtcaagcaagcaagaaccagtttcacaagag
```

ctactactagtagtgtagtactgtggtacagtgcccaatgtcctttctccggactcgactccactaatattctctctctcgcgcggctcgttatattctcgtcatcattggaggcttttagcaagcaagaagagaggcagtggtggtggtggtgaggaggagc tagctagcctgtgcttgctgacgggtgctgagctgaggaaatcgttcgatcgatcgggcgagtcgacgaggggaagagttga gctgaggcgcacagagaacaagatcaacaggcagggtcaccttctccaagcgccgcaacggcctcctcaagaaggcctac gagctgtccgttctctgcgacgccgaggtcgcgctcatcttctccagccgcggaagctctacgagttcggcagcgcc ggggtataattaacagacacaacaacacacacaaccaacaaaccagcatcaattgaacctgcagatctgctgttttctctg atcaattgcttctttttttgttctttttgttcttttatctgctgcaacggcgctcgtctcctctgggttttctgttttcttttcaattat ttttagcaggtgccaaagtagccgagctactatacttacctggccatgttaattttttattccgtctgtctgtgtgtgtctgtgcata ctactatagggacatggcgcgggtgttcttaaaaccgggaggccggatccctaactagcatgggaggatattctttcagcgg atctatacaaaccttactcctgtctgacctcttcttccagtttctccgggtcttcttggattatttggccatcttccgggtgtg cgtgtgtcagagacagctcgaacgataaatttctaaaaccagtagagaggggtgtgtgtgtgtgagaactgagtgga gtagtagcatgaaggctgcaaaactagaaagggaaggtagttcttctcttttgatccatcaggggagccctctggtattaa gat ctttccggcacattgattttcatactttgtgatgacctgggaagaatcggcgtagcagcgtagcaccgctccattttgtcttac cctcacctccccatgctatgaactgatcaatttcattgttcttcatcacccttctccttagctttccacttctctcggaatctcatgcc a tgtttctcagcatgaatcaaatttaattcgtgtttctacttccatatatactggaagaaatttaattagatctattttgctcgggag gtcttcatactttgagttctgatgccatcaccttatttcccccccccttctctgttctatcttcttctcatcttggttgatcattt gatctgtcagttatagcatgatgcatttcaatttgactgtatgtaagtcaaccggaaatatgttgatggattttctatatatacaa cacttgatgtcaggcctgcatctgttctgcttggtggtgtggccaaaattgtctatatttgatcttgccttcttctcctcattt atgacgattcctactacggcttaaacatttcttattctttactaatcatggatgttgcttgactcctagttgttctgtactagctcaa cttggagatcttttatttgcctagttggigggtacgtttgtgacagatctaaaatgggtgcacgaaaaatttacttatttgaa aaaagggagcttaacagggtaaatttcttatttctgtgatgacatttttcttgataagggggatttttataatcgcactcac atgtttatatgtaaaaatctagctcttttgtttgttttggcatatttcccgctaagtataagattatgtggataacattataactttca agatccaatccacatcttgattgtgaaatcatacaatagggaatatcaactgaagggttaattagatgctatatgcatatata tatatatgtgcgcgcgcgcgcgcctgaatttaactatgtatgcatccaactgtttcattgaaaaagattgatattttcagctatt cttttcagtagtatataatattgtttcaatctgttttgaccattataagataaaggcctatattcaccaggcatttgatgatctttt atgcatgaaaaagctgttggtatcacttcaactaaccagacgatctaacaatgtattgtataagaacagaccttgatttcttct gtaaaatcatgcatgtgttcgtttgaattggagtcggcgcgcctgtgtttgaccgtcaggaaagtcttttttccctgaatgt caagggtctatacttctgaagcaattgggacactaatcaattattgtttatcctcggaccatcttttcttctcacaccactaaat cagtttatgccttggaccattaatgtgtgttcacaagcttctgtttatggtttacaaagcattcgcctagatttgtgtgtgtctt acacatcgatcaccttttaatacttgtcgccttcagttattcttttaacgtttggttattatcttatttaaaaaaattatcgattattt attttgtttgtatttatttatacaaaagtatttcaaatatgacttattctttttataagtgcactaattttcaaaataagatgaatgg tcaaatgttacaagaaaaagttaaagcaaccactaattagggcggaggtagtaaaacctagttattgtaaccaataattttatc aatctataaatgcaacacaaaagtcacttcgtgatctcacacaaagccacttcaacgatgaaagctgactgcatgttttatca aaacacatgtgatcagttgttggtatgaaaaaattatctatgcatataatcaagattataataaagcttctggctctacaagt

aacatttctatgttttttttacgttcttacatactatgttttgccaaaaaacatgatcatttgttgacgaaaagaataagtaaa
 tataagagtgcctttgatatcattataatataagcttctgcctctataaataacatctatgcacttttacgtcgtagtaattgatata
 tgagaaatttacatataacattttgtgcagcataaccacc

Esse promotor é um promotor preferido para uso na presente invenção.

2. Terminadores Transcrpcionais

5 Uma variedade de terminadores transcrpcionais está disponível para uso em cassetes de expressão. Esses são responsáveis pela terminação da transcrição além do transgene e correta poliadenilação de mRNA. Terminadores transcrpcionais apropriados são aqueles que são conhecidos por funcionarem em plantas e incluem o terminador CaMV 35S, o terminador tml, o terminador de nopalina sintase e o terminador rbcS E9 de ervilha. Es-
 10 ses podem ser usados tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas. Além disso, um terminador de transcrição de gene nativo pode ser usado.

3. Seqüências para Intensificação ou Regulação de Expressão

Numerosas seqüências foram encontradas para intensificar a
 15 expressão de gene de dentro da unidade transcrricional e essas seqüências podem ser usadas em conjunto com os genes desta invenção para aumentar sua expressão em plantas transgênicas.

Várias seqüências de íntrons têm sido mostradas para intensifi-
 car expressão, particularmente em células monocotiledôneas. Por exemplo,
 20 verificou-se que os íntrons do gene Adhl de milho intensificam significante-
 mente a expressão do gene do tipo selvagem sob seu promotor cognato quando introduzido em células de milho. Verificou-se que íntron 1 é de ex-
 pressão particularmente eficaz e intensificada em constructos de fusão com
 o gene cloranfenicol acetiltransferase (Callis et al., Genes Develop. 1:1183-
 25 1200 (1987)). No mesmo sistema experimental, o íntron do gene bronze1 de
 milho tinha um efeito similar em intensificar expressão. Seqüências de ín-
 trons têm sido rotineiramente incorporadas em vetores de transformação de
 planta, tipicamente dentro do líder não-traduzido.

Várias seqüências líder não-traduzidas derivadas de vírus são
 30 também conhecidas por intensificarem expressão, e estas são particular-

mente eficazes em células dicotiledôneas. Especificamente, seqüências líder de vírus de Mosaico do Tabaco (TMV, a seqüência W"), Vírus de Mosqueado Clorótico de Milho (MCMV), Vírus de Mosaico de Alfafa (AMV) mostraram ser eficazes na intensificação de expressão (por exemplo, Gallie et al., Nucl. Acids. Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski et al. Plant Molec. Biol. 15: 65-79 (1990)). Outras seqüências líder conhecidas da técnica incluem, mas sem limitação: líderes picornavírus, por exemplo, líder EMCV (região de não-codificação 5' da encefalomiocardite) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., e Moss, B. PNAS USA 86:6126-6130 (1989)); líderes potivírus, por exemplo, líder TEV (Vírus "Etch" do Tabaco) (Allison et al., 1986); líder MDMV (Vírus do Mosaico de Nanismo do Milho): Virologia 154:9-20); líder de proteína de ligação de cadeia pesada da imunoglobulina (BiP), (Macejak, D.G., e Sarnow, P., Nature 353: 90-94 (1991)); líder não-traduzido do mRNA de proteína de revestimento do vírus de mosaico da alfafa (AMV RNA 4), (Jobling, S.A., e Gehrke, L., Nature 325:622-625 (1987)); líder do vírus do mosaico do tabaco (TMV), (Gallie, D.R. et al., Molecular Biology of RNA, páginas 237-256 (1989); e Vírus de Mosqueado Clorótico do Milho (MCMV) (Lommel, S.A., et al., Virology 81:382-385 (1991). Vide também, Della Cioppa et al., Plant Physiology 84:965-968 (1987).

Além de incorporar um ou mais dos elementos mencionados acima na região reguladora 5' de um cassete de expressão alvo da invenção, outros elementos peculiares ao cassete de expressão alvo podem ser também incorporados. Tais elementos incluem, mas sem limitação, um promotor mínimo. Por promotor mínimo deve ser entendido que os elementos basais do promotor são inativos ou quase assim sem ativação a montante. Tal promotor tem baixa atividade residual em plantas quando não há transativador presente ou quando o intensificador ou sítios de ligação de elementos de resposta estão ausentes. Um promotor mínimo que é particularmente útil para genes-alvo em plantas é o promotor mínimo Bz1, que é obtido do gene bronze1 de milho. O promotor de núcleo Bz1 é obtido do constructo de mutante Bz1 "myc"-luciferase pBz1LucR98 via clivagem no sítio NheI localizado em -53 a -58. Roth et al., Plant Cell 3: 317 (1991). O fragmento de promotor

de núcleo Bz1 derivado se estende assim de -53 a +227 e inclui o Bz1 íntron-1 na região não-traduzida 5'. Também útil na presente invenção é um promotor mínimo criado pelo uso de um elemento TATA sintético. O elemento TATA sintético possibilita o reconhecimento do promotor por fatores de RNA polimerase e rende um nível basal de expressão de gene na ausência de ativação (vide genericamente, Mukumoto (1993) Plant Mol Biol 23: 995-1003; Green (2000) Trends Biochem Sci 25: 59-63).

4. Marcar Produto Gênico Dentro Da Célula

É conhecida a existência de vários mecanismos para marcar os produtos gênicos, e as seqüências que controlam o funcionamento destes mecanismos têm sido caracterizadas em algum detalhe. Por exemplo, marcar produtos gênicos para o cloroplasto é controlado por uma seqüência de sinais encontrada na extremidade do amino-terminal de várias proteínas, a qual é clivada durante a importação de cloroplastos para produzir a proteína madura (por exemplo, Comai et al., J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988)). Essas seqüências de sinais podem ser fundidas aos produtos gênicos heterólogos para efetuar a importação de produtos heterólogos no cloroplasto (van den Broeck, et al. Nature 313: 358-363 (1985)). DNA que codifica seqüências de sinais apropriadas pode ser isolado da extremidade 5' dos cDNAs que codificam a proteína RUBISCO, a proteína CAB, a enzima EPSP sintase, a proteína GS2 e muitas outras proteínas que são conhecidas por estarem localizadas em cloroplasto. Vide também, a seção intitulada "Expression With Chloroplast Targeting", no Exemplo 37, da Patente US Nº 5.639.949.

Outros produtos gênicos estão localizados em outras organelas tais como a mitocôndria e o peroxissomo (por exemplo, Unger et al. Plant Molec. Biol. 13: 411-418 (1989)). Os cDNAs que codificam esses produtos podem ser também manipulados para efetuar a marcação de produtos gênicos heterólogos para essas organelas. Exemplos de tais seqüências são a ATPases codificadas nucleares e isoformas de aspartato amino transferase específicas para mitocôndria. Marcação de corpos de proteínas celulares foi descrita por Rogers et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6512-6516 (1985)).

Além disso, foram caracterizadas seqüências que causam a marcação de produtos gênicos para outros compartimentos das células. Seqüências amino-terminal são responsáveis por marcar o ER, o apoplasto, e secreção extracelular de células aleurona (Koehler & Ho, Plant Cell 2: 769-783 (1990)). Adicionalmente, seqüências amino-terminal em conjunto com seqüências carbóxi-terminal são responsáveis por marcação vacuolar de produtos gênicos (Shinshi et al., Plant Molec. Biol. 14: 357-368 (1990)).

Através da fusão das seqüências de marcação apropriadas descritas acima para seqüências de transgenes de interesse, é possível direcionar o produto de transgene para qualquer organela ou compartimento da célula. Para marcar cloroplastos, por exemplo, a seqüência de sinais de cloroplasto do gene RUBISCO, o gene CAB, o gene de EPSP sintase ou o gene GS2 é fundida, em estrutura, ao amino terminal ATG do transgene. A seqüência de sinais selecionada deve incluir o sítio de clivagem conhecido, e a fusão construída deve levar em conta quaisquer aminoácidos depois do sítio de clivagem, que são requeridos para clivagem. Em alguns casos, essa exigência pode ser satisfeita pela adição de um pequeno número de aminoácidos entre o sítio de clivagem e o ATG do transgene ou, alternativamente, substituição de alguns aminoácidos dentro da seqüência de transgenes. Fusões construídas para importação de cloroplastos podem ser testadas com respeito à eficácia de captação de cloroplastos por tradução in vitro de construções transcritas in vitro, seguida por captação de cloroplastos in vitro usando técnicas descritas por Bartlett et al., Edelman et al. (Eds.) Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier pp. 1081-1091 (1982) e Wasmann et al. Mol. Gen. Genet. 205: 466-453 (1986). Essas técnicas de construção são bem-conhecidas na arte e são igualmente aplicáveis às mitocôndrias e peroxissomos.

Os mecanismos descritos acima para marcação celular podem ser utilizados não somente em conjunto com seus promotores cognatos, mas também em conjunto com promotores heterólogos de modo a efetuar uma meta de marcação de células específicas sob a regulação transcricional de um promotor que tem padrão de expressão diferente daquele do promo-

tor do qual o sinal de marcação deriva.

C. Construção de Vetores de Transformação de Plantas

5 Numerosos vetores de transformação disponíveis para transformação de plantas são conhecidos daqueles com conhecimento ordinário das técnicas de transformação de plantas, e os genes pertinentes a esta invenção podem ser usados em conjunto com tais vetores. A seleção de vetor dependerá da técnica de transformação preferida e as espécies-alvo para a transformação. Para certas espécies alvo, diferentes marcadores de seleção de antibióticos e herbicidas podem ser preferidos. Marcadores de seleção
10 usados rotineiramente na transformação incluem o gene *nptII*, que confere resistência à canamicina e antibióticos relacionados (Messing & Vierra. *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan et al., *Nature* 304: 184-187 (1983)), o gene *bar*, que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (White et al., *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer et al. *Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990)),
15 gene *hph*, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, *Mol Cell Biol* 4: 2929-2931), e o gene *dhfr*, que confere resistência ao metatrexato (Bourouis et al., *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)), o gene *EPSPS*, que confere resistência ao glifosato (Patente US Nº 4.940.935 e Patente US Nº 5.188.642), e o gene da manose-6-fosfato isomerase, que
20 proporciona a capacidade de metabolizar manose (Patente US Nº 5.767.378 e Patente US Nº 5.994.629).

1. Vetores Adequados para Transformação de Agrobactéria

Muitos vetores estão disponíveis para transformação usando *Agrobacterium tumefaciens*. Esses tipicamente portam pelo menos uma sequência da borda de T-DNA e incluem vetores tais como pBIN19 (Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984)). Abaixo, é descrita a construção de dois vetores típicos adequados para transformação de Agrobactéria.

a. pCIB200 e pCIB2001:

30 Os vetores binários pCIB200 e pCIB2001 são usados para a construção de vetores recombinantes para uso com Agrobactéria e são construídos do seguinte modo. pTJS75kan foi criado por digestão de *NarI* de pTJS75 (Schmidhauser & Helinski, *J. Bacteriol.* 164: 446-455 (1985)) permi-

tindo a excisão do gene de resistência à tetraciclina, seguida pela inserção de um fragmento *AccI* de pUC4K compreendendo NPTII (Messing & Vierra, Gene 19: 259-268 (1982); Bevan et al., Nature 304: 184-187 (1983); McBride et al., Plant Molecular Biology 14: 266-276 (1990)). Ligantes *XhoI* são ligados ao fragmento *EcoRV* de PCIB7 que contém as bordas de T-DNA esquerda e direita, um gene quimérico *nos/nptII* selecionável de planta e o poliligante pUC (Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987)) e o fragmento digerido com *XhoI* são clonados em pTJS75kan digerido com *SII* para criar pCIB200 (vide também EP 0 332 104, Exemplo 19). O pCIB200 contém os seguintes e únicos sítios de restrição de poliligante: *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BglII*, *XbaI*, e *Sall*. pCIB2001 é um derivado de pCIB200 criado por inserção no poliligante de sítios de restrição adicionais. Sítios de restrição únicos no poliligante de pCIB2001 são *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BglII*, *XbaI*, *Sall*, *MluI*, *BclI*, *AvrII*, *ApaI*, *HpaI* e *StuI*. PCIB2001, além de conter esses sítios de restrição únicos, contém também seleção de planta e canamicina bacteriana, bordas de T-DNA esquerda e direita para transformação mediada por *Agrobactéria*, a função *trfA* derivada de RK2 para mobilização entre *E. coli* e outros hospedeiros, e as funções *OriT* e *OriV* também de RK2. O poliligante pCIB2001 é adequado para a clonagem de cassetes de expressão de planta contendo seus próprios sinais reguladores.

b. pCIB10 e Seus Derivados de Seleção de Higromicina

O vetor binário pCIB10 contém um gene que codifica resistência à canamicina para seleção em plantas de seqüências das bordas direita e esquerda de T-DNA e incorpora seqüências do plasmídeo pRK252 de ampla faixa hospedeira permitindo que ele replique tanto na *E.coli* como na *Agrobactéria*. Sua construção é descrita por Rothstein et al. (Gene 53: 153-161 (1987)). Vários derivados de pCIB10 são construídos que incorporam o gene para higromicina B fosfotransferase descritos por Gritz et al. (Gene 25: 179-188 (1983)). Esses derivados permitem a seleção de células de plantas transgênicas somente em higromicina (pCIB743), ou higromicina e caramicina (pCIB715, pCIB717).

2. Vetores Adequados para Transformação de Não-Agrobactéria

Transformação sem o uso de *Agrobacterium tumefaciens* evita a exigência por seqüências de T-DNA no vetor de transformação escolhido e, conseqüentemente, vetores que carecem destas seqüências podem ser utilizados além dos vetores tais como os descritos acima, que contêm seqüências de T-DNA. Técnicas de transformação que não se baseiam em Agrobactéria incluem transformação via bombardeio de partículas, captação de protoplastos (por exemplo, PEG e eletroporação) e microinjeção. A escolha do vetor depende largamente da seleção preferida para as espécies que estão sendo transformadas. Abaixo, é descrita a construção de vetores típicos adequados para transformação de não-agrobactéria.

a. pCIB3064

O pCIB3064 é um vetor derivado de pUC adequado para técnicas de transferências de genes direta em combinação com seleção pelo herbicida basta (ou fosfinotricina). O plasmídio pCIB246 compreende o promotor CaMV 35S em fusão operacional ao gene GUS da *E. coli* e o terminador transcricional CaMV 35S e está descrito no Pedido publicado PCT WO 93/07278. O promotor 35S desse vetor contém duas seqüências 5'de ATG do sítio de início. Esses sítios são mutados usando técnicas de PCR padrão de modo a remover os ATGs e gerar os sítios de restrição SspI e PvuII. Os novos sítios de restrição são de 96 e 37 pb de distância do sítio SII único e 101 e 42 pb de distância do sítio de início real. O derivado resultante de pCIB246 é designado pCIB3025. O gene GUS é então excisado do pCIB3025 por digestão com Sall e SacI, os terminais tornados cegos e religados para gerar o plasmídio pCIB3060. O plasmídio pJIT82 é obtido do John Innes Centre, Noruega e o fragmento SmaI de 400 pb contendo o gene bar de *Streptomyces viridochromogenes* é excisado e inserido no sítio HpaI de pCIB3060 (Thompson et al., EMBO J 6: 2519-2523 (1987)). Isso gerou pCIB3064, que compreende o gene bar sob o controle do promotor CaMV 35S e o terminador para seleção de herbicida, um gene para resistência à ampicilina (para seleção em *E. coli*) e um poliligante com os sítios únicos SphI, PstI, HindIII, e BamHI. Esse vetor é adequado para a clonagem de cassetes de expressão de planta contendo seus próprios sinais reguladores.

b. pSOG19 e pSOG35:

O pSOG35 é um vetor de transformação que utiliza o gene diidrofolato redutase (DFR) da *E. coli* como um marcador selecionável que confere resistência ao metotrexato. PCR é usado para amplificar o promotor 35S (-800 pb), íntron 6 do gene Adh1 do milho (-550 pb) e 18 pb da sequência líder não-traduzida de GUS de pSOG10. Um fragmento de 250 pb que codifica o gene tipo II de diidrofolato redutase de *E. coli* é também amplificado por PCR e estes dois fragmentos de PCR são montados com um fragmento de SacI-PstI de pB1221 (Clontech) que compreende a estrutura principal do vetor pUC19 e o terminador de nopalina sintase. A montagem desses fragmentos gera pSOG19 que contém o promotor 35S em fusão com a sequência de íntron 6, o líder GUS, o gene DHFR e o terminador de nopalina sintase. Substituição do líder GUS no pSOG19 com a sequência líder do Vírus do Mosqueado Clorótico de Milho (MCMV) gera o vetor pSOG35. O pSOG19 e pSOG35 transportam o gene pUC para resistência à ampicilina e têm sítios HindIII, SphI, PstI e EcoRI disponíveis para a clonagem de substâncias estranhas.

3. Vetor Adequado para Transformação de Cloroplasto

Para expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção em plastídios de plantas, o vetor de transformação de plastídio pPH143 (WO 97/32011, Exemplo 36) é usado. A sequência de nucleotídeos é inserida no pPH143 repondo a sequência de codificação de PROTOX. Esse vetor é então usado para transformação de plastídio e seleção de transformantes para resistência à espectinomicina. Alternativamente, a sequência de nucleotídeos é inserida no pPH143 de modo que ela repõe o gene aadH. Nesse caso, os transformantes são selecionados para resistência aos inibidores PROTOX.

D. Transformação

Uma vez que a sequência de ácidos nucléicos da invenção foi clonada em um sistema de expressão, ela é transformada em uma célula de plantas. O receptor e cassete de expressão alvo da presente invenção podem ser introduzidos na célula da planta de vários modos conhecidos da

técnica. Métodos para regeneração de plantas são também bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, vetores de plasmídeo Ti têm sido utilizados para a distribuição de DNA estranho, bem como captação direta de DNA, lipossomas, eletroporação, microinjeção, e microprojéteis. Além disso, bactérias do gênero *Agrobactéria* podem ser utilizadas para transformar células de plantas. Abaixo, estão descrições de técnicas representativas para transformar tanto as plantas dicotiledôneas como as monocotiledôneas, bem como uma técnica de transformação de plastídio representativo.

1. Transformação de Dicotiledôneas

As técnicas de transformação para dicotiledôneas são bem-conhecidas na técnica e incluem técnicas com base em *Agrobactéria* e técnicas que não requerem *Agrobactéria*. Técnicas de Não-*Agrobactéria* que envolvem a captação de material genético exógeno diretamente por protoplastos ou células. Isso pode ser obtido por PEG ou captação mediada por eletroporação, distribuição mediada por bombardeio de partículas, ou microinjeção. Exemplos dessas técnicas são descritos por Paszkowski et al., EMBO J 3: 2717-2722 (1984), Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199: 169-177 (1985), Reich et al., Biotechnology 4: 1001-1004 (1986), e Klein et al., Nature 327: 70-73 (1987). Em cada caso, as células transformadas são regeneradas para as plantas inteiras usando técnicas-padrão conhecidas da técnica.

Transformação mediada por *Agrobactéria* é uma técnica preferida para transformação de dicotiledôneas devido a sua alta eficácia de transformação e usa ampla utilidade com muitas espécies diferentes. Transformação de *Agrobactéria* envolve tipicamente a transferência do vetor binário transportando o DNA estranho de interesse (por exemplo, pCIB200 ou pCIB2001) para uma cepa de *Agrobactéria* apropriada que pode depender do complemento de genes vir pela cepa *Agrobactéria* hospedeira, tanto em um plasmídeo Ti co-residente ou cromossomicamente (por exemplo, cepa CIB542 para pCIB200 e pCIB2001 (Uknes et al. Plant Cell 5: 159-169) (1993)). A transferência do vetor binário recombinante para *Agrobactéria* é obtida por um procedimento de conjugação triparental usando *E. coli* transportando o vetor binário recombinante, uma cepa auxiliar de *E. coli* que

transporta um plasmídio tal como pRK2013 e o qual é capaz de mobilizar o vetor binário recombinante para a cepa de *Agrobactéria*-alvo. Alternativamente, o vetor binário recombinante pode ser transferido para a *Agrobactéria* por transformação de DNA (Hofgen & Willmitzer, Nucl. Acids. Res. 16: 9877

5 (1988)).

A transformação das espécies de plantas-alvo por *Agrobactéria* recombinante envolve usualmente co-cultura da *Agrobactéria* com explantes da planta e segue os protocolos bem-conhecidos na técnica. O tecido transformado é regenerado em meio selecionável compreendendo o marcador de resistência a antibiótico ou herbicida presente entre as bordas do T-DNA do plasmídio binário.

Uma outra abordagem para transformar células de plantas com um gene envolve propelir partículas inertes ou biologicamente ativas em tecidos ou células de plantas. Essa técnica é descrita nas Patentes US Nº 4.945.050, US Nº 5.036.006, e US Nº 5.100.792, todas de Stanford et al. Geralmente, esse procedimento envolve propelir partículas inertes ou biologicamente ativas nas células sob condições eficazes para penetrar a superfície externa da célula e pode proporcionar incorporação dentro do interior desta. Quando partículas inertes forem utilizadas, o vetor pode ser introduzi-

20 do nas células por revestimento das partículas com o vetor que contém o gene desejado. Alternativamente, a célula alvo pode ser circundada pelo vetor de modo que o vetor seja transportado para a célula pelo estímulo da partícula. Partículas biologicamente ativas (por exemplo, células de leveduras secas, bactérias secas ou um bacteriófago, cada um contendo DNA destinado a ser introduzido) podem ser também propelidas no tecido de célula da planta.

25

2. Transformação de Monocotiledôneas

A transformação da maioria das espécies de monocotiledôneas tem também se tornado rotina. Técnicas preferidas incluem transferência direta de gene em protoplastos usando PEG ou técnicas de eletroporação, e bombardeio de partículas em tecido de calos. As transformações podem ser

30 efetuadas com uma espécie de DNA simples ou espécies de DNA múltiplos

(isto é, co-transformação) e ambas as técnicas são adequadas para uso com esta invenção. A co-transformação pode ter a vantagem de evitar a completa construção de vetor e de gerar plantas transgênicas com locais não ligados para o gene de interesse e o marcador selecionável, permitindo a remoção do marcador selecionável em gerações subseqüentes, caso isso seja considerado desejável. Contudo, uma desvantagem do uso de co-transformação é a frequência menor que 100% com a qual as espécies de DNA separadas são integradas no genoma (Schocher et al., *Biotechnology* 4: 1093-1096 (1986)).

Os Pedidos de Patente EP 0 292 435, EP 0 392 225 e WO 93/07278 descrevem técnicas para a preparação de calo e protoplastos de uma linhagem endógama de elite de milho, transformação de protoplastos usando PEG ou eletroporação, e a regeneração de plantas de milho de protoplastos transformados. Gordon-Kamm et al. (*Plant Cell* 2: 603-618 (1990)) e Fromm et al. (*Biotechnology* 8: 833-839 (1990)) publicaram técnicas para transformação de linhagem de milho derivada de A188 usando bombardeio de partículas. Além disso, WO 93/07278 e Koziel et al. (*Biotechnology* 11: 194-200 (1993)) descrevem técnicas para a transformação de linhagens endógamas de elite de milho por bombardeio de partículas. Essa técnica utiliza embriões imaturos de milho de comprimento de 1,5-2,5 mm excisados de uma orelha de milho de 14 a 15 depois da polinização e um dispositivo biolístico PDS 1000He para bombardeio.

Transformação de arroz pode ser efetuada por técnicas de transferência direta de gene utilizando protoplastos ou bombardeio de partículas. Transformação mediada por protoplastos foi descrita para tipos Japônica e tipos Índica (Zhang et al. *Plant Cell Rep* 7: 379-384 (1988); Shimamoto et al. *Nature* 338: 274-277 (1989); Datta et al. *Biotechnology* 8: 736-740 (1990)). Ambos os tipos são também rotineiramente transformáveis usando bombardeio de partículas (Christou et al. *Biotechnology* 9: 957-962 (1991)). Além disso, WO 93/21335 descreve técnicas para a transformação de arroz via eletroporação.

O Pedido de Patente EP 0 332 581 descreve técnicas para a

geração, transformação e regeneração de protoplastos de Pooideae. Essas técnicas possibilitam a transformação de *Dactylis* e trigo. Além disso, a transformação de trigo foi descrita por Vasil et al. (Biotechnology 10: 667-674 (1992)) usando bombardeio de partículas nas células de calos regeneráveis de longo prazo tipo C, e também por Vasil et al. (Biotechnology 11: 1553-1558 (1993)) e Weeks et al. (Plant Physiol. 102: 1077-1084 (1993)) usando bombardeio de partículas de embriões imaturos e calos derivados de embriões imaturos. Contudo, uma técnica preferida para transformação de trigo envolve a transformação de trigo por bombardeio de partículas de embriões imaturos e inclui tanto uma etapa com alta sacarose ou com alta maltose antes da distribuição de genes. Antes do bombardeio, qualquer número de embriões (0,75-1 mm de comprimento) é revestido em um meio MS com 3% de sacarose (Murashiga & Skoog, Physiologia Plantarum 15: 473-497 (1962)) e 3 mg/L de 2,4-D para indução de embriões somáticos, o qual pode prosseguir no escuro. No dia escolhido para o bombardeio, os embriões são removidos do meio de indução e colocados sobre o osmótico (isto é, meio de indução com sacarose ou maltose adicionada na concentração desejada, tipicamente 15%). Os embriões são deixados plasmolisar por 2 a 3 horas e são então bombardeados. Vinte embriões por placa-alvo são típicos, embora não-críticos. Um plasmídeo transportando gene apropriado (tal como pCIB3064 ou pSG35) é precipitado sobre partículas de ouro de tamanho micrométrico, usando procedimentos-padrão. Cada placa de embriões é submetida a disparo com o dispositivo com hélio DuPont Biolistics.RTM., usando uma pressão explosiva de cerca de 6.895 MPa (1.000 psi) e usando uma peneira padrão de 80 mesh. Depois do bombardeio, os embriões são colocados de volta no escuro para recuperação por cerca de 24 horas (ainda no osmótico). Depois de 24 horas, os embriões são removidos do osmótico e colocados de volta no meio de indução onde eles ficam por cerca de um mês antes da regeneração. Aproximadamente um mês mais tarde, os explantes de embriões com calos embriogênicos em desenvolvimento são transferidos para o meio de regeneração (MS+1 mg/L de NAA, 5 mg/L de GA), contendo ainda o agente de seleção apropriado (100 mg/l de basta no caso de

pCIB3064 e 2 mg/L de metotrexato no caso de pSOG35). Depois de aproximadamente um mês, os brotos desenvolvidos são transferidos para recipientes conhecidos como "GA7s", que contêm MS semi-resistente, 2% de sacarose, e a mesma concentração de agente de seleção.

5 A transformação de monocotiledôneas usando *Agrobactéria* foi também descrita. Vide, WO 94/00977 e a Patente US Nº 5.591.616, ambos são aqui incorporados a título de referência. Vide também Negrotto et al., Plant Cell Reports 19: 798-803 (2000), aqui incorporada a título de referência.

10 Por exemplo, arroz (*Oryza sativa*) pode ser usado para gerar plantas transgênicas. Várias cultivares de arroz podem ser usadas (Hiei et al., 1994, Plant Journal 6:271-282); Dong et al., 1996, Molecular Breeding 2:267-276; Hiei et al., 1997, Plant Molecular Biology, 35:205-218). Também, os vários constituintes dos meios descritos abaixo podem ter as quantidades
15 variadas ou serem substituídos. Respostas embriogênicas são iniciadas e/ou as culturas são estabelecidas a partir de embriões maduros por cultivo no meio MS-CIM (Sais basais do MS, 4,3 g/L; vitaminas B5 (200 vezes), 5ml/L; Sacarose, 30 g/L; prolina, 500 mg/L; glutamina, 500 mg/L; hidrolisado de caseína, 300 mg/L; 2,4-D (1 mg/ml), 2ml/L; ajustar o pH para 5,8 com KOH a
20 1N; Phytigel, 3 g/L). Tantos os embriões maduros nos estágios iniciais de resposta à cultura como as linhagens de culturas estabelecidas são inoculados e co-cultivados com a cepa *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (*Agrobactéria*) contendo a construção de vetor desejada. A *Agrobactéria* é cultivada de estoques de glicerol em meio de YPC sólido (100 mg/L de espectinomicina e qualquer outro antibiótico apropriado) por cerca de 2 dias a 28°C. A
25 *Agrobactéria* é ressuspensa em meio MS-CIM líquido. A cultura de *Agrobactéria* é diluída para uma OD600 de 0,2 a 0,3 e acetossiringona é adicionada para uma concentração final de 200 µM. Acetossiringona é adicionada antes de misturar a solução com as culturas de arroz para induzir a *Agrobactéria*
30 para transferência de DNA para as células da planta. Para inoculação, as culturas de planta são imersas na suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana líquida é removida e as culturas inoculadas são colocadas no meio

de co-cultivo e incubadas a 22°C, por dois dias. As culturas são então transferidas para o meio MS-CIM com Ticarcilina (400 mg/L) para inibir o crescimento da Agrobactéria. Para constructos utilizando o gene de marcador selecionável PMI (Reed et al., In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:127-132), as

5 culturas são transferidas para o meio de seleção contendo Manose como fonte de carboidrato (MS com 2% de Manose, 300 mg/L de Ticarcilina) depois de 7 dias, e cultivadas por 3 a 4 semanas, no escuro. Colônias resistentes são então transferidas para o meio de indução de regeneração (MS sem 2,4-D, 0,5 mg/L de IAA, 1 mg/L de zeatina, 200 mg/L de timentina, 2% de

10 manose e 3% de Sorbitol) e crescidas no escuro por 14 dias. Colônias em proliferação são então transferidas para um outro ciclo de meio de indução de regeneração e movidas para a sala de crescimento, clara. Brotos regenerados são transferidos para recipientes GA7 com meio GA7-1 (MS sem hormônios e 2% de Sorbitol) por 2 semanas e então movidos para a estufa

15 quando eles estão grandes o bastante e têm raízes adequadas. As plantas são transplantadas para o solo na estufa (Para geração) e crescidas para maturidade e a semente T₁ é colhida.

3. Transformações de Plastídios

Sementes de *Nicotiana tabacum* c.v. "Xanthienc" são germinadas, sete por placa, em uma disposição circular de 2,54 cm (1 polegada) no

20 meio de ágar T e bombardeadas durante 12 a 14 dias após implanta com partículas de tungstênio de 1 µm (M10, Biorad, Hercules, CA) revestidas com DNA dos plasmídios pPH143 e pPH145, essencialmente conforme descrição (Svab, Z. e Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913-917). As sementeiras

25 bombardeadas são incubadas em meio T por dois dias, depois do que as folhas são cortadas e colocadas com o lado abaxial para cima em luz brilhante (350-500 µmols de fótons/m²/s) em placas de meio RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. e Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526-8530) contendo 500 µg/ml de dicloridrato de espectinomicina (Sigma, St. Louis, Mo). Brotos resis-

30 tentes surgindo embaixo das folhas alvejadas, três a oito semanas após o bombardeio, são subclonados no mesmo meio seletivo, deixados formarem calos, e os brotos secundários isolados e subclonados. Segregação comple-

ta das cópias do genoma de plastídios transformados (homoplasmicidade) em subclones independentes é avaliada por técnicas-padrão de Southern blotting (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). DNA celular total digerido com BamHI/EcoRI (Mettler, I.J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346349) é separado em 1% de Tris-borato (TBE)-géis de agarose, transferido para membranas de náilon (Amersham) e sondados com seqüências de DNA sensibilizadas aleatoriamente e marcadas com ^{32}P correspondendo a 0,7 kb de fragmento de DNA BamHI/HindIII de pC8 contendo uma porção da seqüência de marcação de plastídios rps {fração (7/12)}. Brotos homoplásmicos são enraizados assepticamente em meio de MS/IBA contendo espectimomicina (McBride, K.E. et al., (1994) PNAS 91, 7301-7305) e transferidos para a estufa.

V. Cruzamento e Produção de Sementes

15 A. Cruzamento

As plantas obtidas via transformação com uma seqüência de ácidos nucléicos da presente invenção podem ser qualquer uma de uma ampla variedade de espécies de plantas, incluindo aquelas de monocotiledôneas e dicotiledôneas; contudo, as plantas usadas no método da invenção são preferivelmente selecionadas da lista de colheitas-alvo agronomicamente importantes, estabelecidas acima. A expressão de um gene da presente invenção em combinação com outras características importantes para a produção e qualidade pode ser incorporada em linhagens de plantas através de cruzamento. Abordagens e técnicas de cruzamento são conhecidas da técnica. Vide, por exemplo, Welsh J.R., Fundamentals of Plant Genetics and Breeding, John Wiley & Sons, Nova Iorque (1981); Crop Breeding, Wood D.R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., The Theory of Plant Breeding, 2ª Edição, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D.P., Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests, Springer-Verlag, Nova Iorque (1986); e Wricke e Weber, Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding, Walter de Gruyter and Co., Berlim (1986).

As propriedades genéticas engenheiradas nas sementes e plan-

tas descritas acima são transmitidas por reprodução sexual ou crescimento vegetativo e podem ser assim mantidas e propagadas nas plantas progê-
nies. Geralmente, a dita manutenção e propagação fazem uso de métodos
agrícolas conhecidos desenvolvidos para adaptação de propósitos específi-
cos tais como lavar, semear ou colher. Processos especializados, tais como
5 tecnologias de hidropônicos ou de estufa, podem ser aplicados. Como a co-
lheita em crescimento é vulnerável ao ataque e danos provocados por inse-
tos ou infecções, bem como à competição de ervas daninhas, medidas são
tomadas para controlar as ervas daninhas, doenças de plantas, insetos, ne-
matódeos, e outras condições adversas para melhorar o rendimento. Essas
10 incluem medições mecânicas tais como lavragem do solo ou remoção das
ervas daninhas e plantas infectadas, bem como a aplicação de defensivos
agrícolas, tais como herbicidas, fungicidas, gametocidas, nematicidas, regu-
ladores de crescimento, agentes de amadurecimento e inseticidas.

15 O uso das propriedades genéticas vantajosas das plantas trans-
gênicas e sementes, de acordo com a invenção, pode ser feito ainda no cru-
zamento da planta, que almeja o desenvolvimento de plantas com proprie-
dades aperfeiçoadas tais como tolerância a pestes, herbicidas ou estresse,
valor nutricional aperfeiçoado, rendimento aumentado, ou estrutura aperfei-
20 çoadas causando menor perda de instalação ou por destruição. As várias e-
tapas de cruzamento são caracterizadas por intervenção humana bem defi-
nida tal como seleção das linhagens a serem cruzadas, direcionamento da
polinização das linhagens parentais, ou seleção de plantas progênes apro-
priadas. Dependendo das propriedades desejadas, medições de cruzamen-
25 tos diferentes são tomadas. As técnicas relevantes são bem-conhecidas na
arte e incluem, mas sem limitação, hibridização, endogamia, cruzamento
com linhagens múltiplas, combinação de variedades, hibridização interespe-
cífica, técnicas aneuplóides, etc. Técnicas de hibridização incluem também a
esterilização das plantas para render plantas machos ou fêmeas por meios
30 mecânicos, químicos, ou bioquímicos. A polinização cruzada de uma planta
estéril macho com pólen de uma linhagem diferente assegura que o genoma
da planta macho estéril, mas fêmea fértil obterá uniformemente propriedades

de ambas as linhagens parentais. Assim, as sementes transgênicas e plantas de acordo com a invenção podem ser usadas para o cruzamento de linhagens de plantas aperfeiçoadas, que, por exemplo, aumentam a eficácia dos métodos convencionais tal como tratamento com herbicida ou com pesticida ou permitem que se dispense com os ditos métodos devido às suas propriedades genéticas modificadas. Alternativamente, novas colheitas com aperfeiçoada tolerância ao estresse podem ser obtidas, que, devido ao seu "equipamento" genético otimizado, rendem um produto colhido de melhor qualidade que os produtos que não foram capazes de tolerar condições de desenvolvimento adversas, comparáveis.

B. Produção de Sementes

Na produção de sementes, a qualidade da germinação e a uniformidade das sementes são características essenciais do produto. Como é difícil manter uma colheita livre de outra colheita e de sementes de ervas daninhas, para controlar doenças contidas nas sementes, e para produzir sementes com boa germinação, práticas de produção de sementes razoavelmente extensivas e bem definidas têm sido desenvolvidas por produtores de sementes, que são experientes na técnica de crescimento, acondicionamento e comercialização de semente pura. Assim, é prática comum para o fazendeiro comprar semente certificada que satisfaz os padrões específicos de qualidade em vez de usar semente colhida de sua própria colheita. Material de propagação a ser usado como sementes é usualmente tratada com um revestimento protetor que compreende herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematicidas, moluscicidas, ou misturas destes. Costumemente, os revestimentos protetores usados compreendem compostos tais como captano, carboxina, tiram (TMTD.TRM), metalaxila (Apron.RTM), e pirimifos-metila (Actellic.RTM.). Se desejado, esses compostos são formulados juntamente com mais veículos, tensoativos ou adjuvantes promotores de aplicação costumeiramente empregados nas técnicas de formulação para proporcionar proteção contra danos causados por pragas bacterianas, fúngicas ou animais. Os revestimentos protetores podem ser aplicados por impregnação do material de propagação com uma formulação líquida ou por

revestimento com uma formulação úmida ou seca, combinadas. Outros métodos de aplicação são também possíveis tais como tratamento direcionado nos brotos ou na fruta.

- Os seguintes exemplos são dados a título de ilustração e explanação, e não têm como objetivo limitar a invenção, em qualquer modo.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Transformação de Agrobactéria do Milho – Embriões Imaturos

Preparação da Orelha

- 10 Colher orelhas quando os embriões imaturos nos grãos centrais forem de aproximadamente 0,5 a 1,0 mm.

Debulhar e esterilizar as orelhas em uma solução de 20% de Clorox e 3 gotas de Tween/litro de solução. Colocar em um agitador orbital por 20 minutos.

- 15 Enxaguar as orelhas, três vezes, com ddH₂O estéril.

Em um ambiente estéril, cortar os topos dos grãos. Colocar a orelha em uma placa de Petri e isolar os embriões imaturos.

Preparar a solução de inoculação para transformação

- 20 • A 100ml de meio de LP-Lsinf., adicionar 50 µL de solução de estoque de acetossiringona (AS) (40 mg/ml de estoque/ml) para uma concentração final de 100 µM de AS.

• Pipetar 4ml (2,5) do meio de infecção em 10ml de tubo descartável.

- 25 • Preparar tubos Eppendorf para coletar os embriões nesse momento e adicionar ~1,4ml do meio de infecção com AS a eles.

Preparação de suspensão de Agrobactéria

• Tomar uma alça Agrobactéria e ressuspendê-la por turbilhamento em um tubo descartável de 10ml com 4ml (2,5ml) de meio de infecção.

- 30 • Medir a densidade óptica da suspensão de Agrobactéria. Ajustar a OD₆₆₀ para aproximadamente 0,45 a 0,55.

Isolamento de Embriões Imaturos e Transformação

- Excisar os embriões e colocá-los no topo do meio de infecção em um tubo Eppendorf.

- Excisar os embriões por 30 a 35 minutos para obter um total de ~150 embriões.

- 5
- Turbilhonar os embriões (agitar manualmente) por 5 segundos.
 - Impingir termchoque aos embriões em banho de água a 45°C, por 5 minutos. Não deixar que a tampa do tubo Eppendorf entre em contato com a água (possíveis problemas de contaminação).

- 10
- usar uma pipeta descartável para remover o meio de infecção e substituir com 1,5 ml de suspensão de Agrobactéria. Turbilhonar por 30 segundos.

- Deixar que o tubo assente por 5 minutos.

- Agitar o tubo para suspender os embriões e verter em uma placa de Petri com meio AS 500 modificado com LS.

- 15
- Pipetar a suspensão de Agrobactéria e transferir os embriões para uma área da placa que não tenha sido exposta à Agrobactéria.

Ter certeza absoluta que todos os embriões estão com o lado do escutelo para cima.

Co-cultivo

- 20
- Co-cultivar embriões e a Agrobactéria, a 23°C, por 2 a 3 dias.

Indução de calos nos embriões/somática

- Transferir o tecido (18 embriões/placa) para o meio de pré-seleção/indução de calos por 10 a 14 dias a 28°C, no escuro.

Seleção da Manose

- 25
- Transferir grupos de calos no meio de Seleção. 9 grupos por placa. Cultivar por aproximadamente 2 semanas a 28°C, no escuro.

- Checar as culturas quanto à contaminação e resposta de calos e cultivar por mais 2 semanas a 28°C, no escuro.

- 30
- Transferir 4 eventos por placa de tecido de crescimento para o meio de regeneração de MS (R1) e deixar no escuro por 10 a 14 dias.

Transferir tecido em crescimento/plantas de 4 eventos por placas para a luz, por 14 dias, no claro.

Transferir os eventos para meios de formação de raízes em recipientes de cultura de tecido (2 eventos/ recipiente Greiner).

Milho transgênico foi crescido na estufa para o estágio T0 ou T1, e amostras de sabugo ou de outros materiais foram selecionadas dos eventos transgênicos produzidos. Os plasmídios mostrados na Figura 1 e na Figura 2 mostram os plasmídios (pSyn12210 contendo o constructo CAD RNAi, e pSyn12345 contendo o constructo COMT RNAi) usados no protocolo de transformação de milho dado acima.

Exemplo 2

10 Seleção de evento T1 CAD pSyn12210

As amostras de sabugo T1 de um total de 15 eventos (10 de cópia baixa, 3 média e 2 alta) incluem 65 linhagens (28 linhagens de cópia baixa, 14 de cópia média, 5 de cópia alta e 18 nula para controle) foram enviadas para análise de MSU para NDF (fibra), ADL (lignina), IVNDFD (digestibilidade de NDF *in vitro*). 3 isolinhagens BM3 e 2 checagens de híbridos foram também incluídas. Foi comparada a diferença entre as linhagens (transgênicas versus nulas) do mesmo evento, entre os eventos, ou entre os eventos de cópia baixa, média e alta com os controles positivos BM3 ou negativos e checagem de híbridos. Embora algumas destas tenham ficado nas 16 linhagens de topo mencionadas abaixo, nenhuma destas mostrou redução consistente de lignina nos testes futuros. Os dados estão na Tabela 1 e os métodos usados para análise são dados abaixo.

Seleção de evento T1 COMT (pSyn 12345)

Análise do sabugo T1: 41 eventos totais (23 de cópia baixa, 13 de média, e 5 de alta) incluem 131 linhagens (24 linhagens de cópia baixa, 13 de média, 8 de alta e 20 de nulo para controle) foram enviados para MSU para análises (ADL, NDF, IVNDFD), isolinhagens 3BM3, uma de controle JHAX707 e uma para checagem de híbridos foram também incluídas.

Análise de sabugo T1: As 7 linhagens de topo contendo pSyn12210 ou pSyn12345 foram selecionadas com base no teor de lignina e dados de digestibilidade *in vitro*. Essas linhagens mostraram redução do teor de lignina e aperfeiçoada digestibilidade em comparação com o sabugo de

controle conforme mostrado na Tabela 1. Os dados referentes aos dois melhores eventos contendo plasmídio pSyn12345 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1

Características de ensilagem de eventos selecionados contendo nocautes de RNAi ou de CAD ou de COMT. Em 2 resíduos genéticos em comparação com linhagens nulas do mesmo evento. DM = matéria seca, NDF = Fibra Detergente Neutra, ADF = Fibra Detergente Ácida, IVTD = Digestibilidade real *in vitro*, IVNDFD = Desaparecimento de NFD *in vitro*.

Evento	Nocaute de Gene	Cruzamento	Geração	% de meio de DM	% de meio de CINZAS	% de meio de NDF	% de meio de ADF	% de meio de Lignina	% de meio de IVTD	% de meio de IVNDFD
				MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
1	Nulo CAD	1	T2	89,4 89,3 -0,1	2,6 3,1 0,5	67,0 64,9 -2,1	37,1 35,2 -1,9	5,0 4,3 -0,7	59,6 64,3 4,7	39,9 45,0 5,1
2	Nulo CAD	1	T2	90,5 89,5 -0,7	1,2 2,7 1,5	76,6 70,9 -5,7	41,9 39,3 -2,6	5,5 5,1 -0,5	53,0 59,8 6,7	38,7 43,5 4,8
3	Nulo COMT	1	T2	94,0 94,3 0,3	3,2 3,1 -0,1	77,1 75,6 -1,5	44,7 43,7 -0,9	6,6 5,8 -0,8	49,4 53,5 4,1	34,4 38,5 4,1
4	Nulo COMT	1	T1	92,4 90,1 -2,2	2,5 3,4 0,9	77,1 75,6 -1,5	45,2 43,2 -2,1	6,8 6,0 -0,8	48,8 53,3 4,5	33,6 38,3 4,7

Evento	Nocaute de Gene	Cruzamento	Geraçao	% de meio de DM	% de meio de CINZAS	% de meio de NDF	% de meio de ADF	% de meio de Lignina	% de meio de IVTD	% de meio de IVNDFD
				MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
4	Nulo COMT	1	T2	88,8 87,7 -1,1	3,4 3,1 -0,2	78,9 72,7 -6,2	45,3 40,6 -4,7	6,6 5,7 -0,9	50,1 57,0 7,0	36,7 40,9 4,2
5	Nulo COMT	1	T2	89,0 88,8 -0,2	2,7 3,4 0,7	78,2 70,5 -7,7	44,8 39,2 -5,6	6,8 5,6 -1,2	51,0 59,0 7,9	37,4 42,2 4,7
6	Nulo COMT	1	T2	89,8 89,6 -0,2	2,4 3,1 0,6	82,6 78,8 -3,9	46,7 43,7 -3,0	6,6 5,8 -0,8	43,3 50,8 7,5	31,4 37,6 6,2
7	Nulo COMT	2	T1	n/a n/a	n/a n/a	n/a n/a	n/a n/a	6,3 5,6	n/a n/a	n/a n/a
	Bmr isogênico			89,5	3,4	84,7	48,3	6,1	47,7	38,3
	Bmr normal			89,5 0	3,2 -0,2	80,1 -4,6	42,4 -5,9	1,7 -4,4	73,2 25,5	66,6 28,3

Tabela 2

Dados mostrando redução consistente em % de lignina e aumento em % de IVNDFD para 2 eventos de topo

Evento		Lignina (%)		IVNDFD (%)		
		Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2	Expt 3
3	Nulo	6,6	5,6	34,4	35,8	27,1
	COMT	5,8	4,9	38,5	40,0	31,4
6	Nulo	6,6		31,4	33,0	
	COMT	5,8	6,2	37,6	40,3	31,6
Bm3*		1,7		66,6	68,0	53,5
Bm3 iso		6,1		38,3	41,2	34,2

Para metodologias gerais aplicáveis a essas análises, vide:

- 5 Goering, H.K., e P.J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses. Apparatus, Reagents, Procedures, and some applications. Agric. Handbook N° 379. ARS-USDA.

ADF – Fibra Detergente Ácida – (método Van Soest)

- 10 Realizada em capela química, com equipamento apropriado que inclui jaleco resistente a produtos químicos, capa para laboratório, luvas de borracha resistente a produtos químicos, óculos de segurança.

- 15 O método de ADF hidrolisa os componentes da parede celular que inclui pectinas e hemiceluloses. A fração remanescente, chamada de ADF contém celulose, lignina e cinzas. Ela é expressa como porcentagem da fração da parede celular total.

O resíduo de ADL é gerado a partir da fração de ADF, e representa lignina + cinzas.

- 20 A etapa inicial é para recuperar a fração da parede celular de um tecido de planta particular. Em outras palavras ela eliminará compostos solúveis, tais como açúcares, proteínas, óleo e fibra solúvel. Se a amostra contiver uma grande quantidade de óleo (tal como sementes de soja) então lavagem com acetona será requerida (inicialmente triturar, então usar um tubo de vidro, ou tempo de incubação em tubo de plástico curto). O tecido é seco e triturado em partículas de não mais que 2 mm de tamanho. Tipicamente, cerca de 2 a 3 g de tecido são adicionados a um tubo cônico de
- 25

50ml. Então, 40ml de etanol a 80% são adicionados, e misturados por 5 horas em um agitador giratório. Uma outra lavagem é requerida durante a noite. Então, 40ml de água são adicionados durante uma lavagem de 1 hora, repetindo a lavagem em um total de 3 vezes. Algum tecido será perdido durante as trocas de solução. Uma lavagem preliminar deve ser feita para estimar a quantidade de tecido inicial para produzir cerca de 1 g de amostra de parede celular final.

No caso de tecido de sabugo, devido ao teor de parede celular ser muito alto, não há necessidade de se fazer uma preparação da parede celular. Assim, as análises de ADF e ADL serão calculadas com base no total de matéria seca.

Solução de ADF

2% de CTAB em H_2SO_4 a 1N

(para 1 litro de estoque, adicionar 20 g de CTAB para 900ml de água deionizada (di), agitar por poucos minutos até redução do tamanho de partícula. Então, adicionar 62,5ml de ácido sulfúrico 16N (Fisher A298-212, 98%, densidade de 1,84 g/ml). Conforme o ácido é adicionado, a mistura de CTAB + água/ácido se torna solubilizada. Preencher para 1 L com água deionizada.

A solução de ADF pode ser também adquirida da ANKOM (www.ankom.com).

Registrar o peso da sacola da ANKOM.

Pesar 250 mg de uma amostra secada a ar (de com/ou sem incubação a 37°C de amostra seca).

Verter no saco de filtro (tipo F57) da ANKOM; registrar o peso.
Vedar com termovedador.

Adicionar a um béquer de vidro Pyrex de 2.000ml, tipicamente 20 sacolas (24 max.) com 500ml da solução ADF. Cobrir com placa Pyrex de 1.000ml. Colocar em placa de vidro (Pyrex, diâmetro de 190 mm X 100 mm de altura), preenchida com água em ebulição. Adicionar, também, algumas pedras de PTFE em ebulição à placa. A água deve ser mantida em ebulição por 1 hora. Agitar os sacos a cada 15 minutos.

Enxaguar no mínimo 4 vezes com H_2O a 85-90°C. Todo o rejeito líquido é descartado em uma pia com água corrente contínua. Mais dois minutos de enxágüe com pequeno volume de acetona, que é então descartado em recipiente com rejeito de solvente.

5 Secar a 70°C, em forno, durante a noite.

Pesar tecido residual = ADF.

ADL – Lignina Detergente Ácida

Realizada em capela química, com equipamento apropriado que inclui jaleco resistente a produtos químicos, capa para laboratório, luvas de
10 borracha resistentes a produtos químicos, óculos de segurança.

Ao resíduo de ADF seco (20-40 sacolas), adicionar 500ml de ácido sulfúrico a 72%, cobrir todas as sacolas.

Usar um béquer de vidro Pyrex de 2.000ml, com 20 sacolas (24 no máximo) e cobrir com uma placa Pyrex de 1.000ml.

15 NOTA: ácido sulfúrico a 72% pode ser preparado por adição de 750ml de ácido concentrado (95%) em 250ml de água. Cuidado: a mistura é muito quente e requer que o ácido seja vertido lentamente para evitar projeções. A garrafa é ainda colocada em um banho de água à temperatura ambiente (2 enxágües) para resfriamento rápido e uso. Pode-se também adquirir o H_2SO_4 a 72% da Ankom.
20

Incubar à temperatura ambiente, por 3 horas, agitar várias vezes.

Excesso de ácido é descartado em rejeito de ácido líquido.

Então enxaguar, pelo menos cinco vezes com água quente (85 a
25 90°C). As lavagens são realizadas na pia.

Enxágüe final em acetona por 2 minutos, descartar o solvente em um contêiner para lixo.

Secar em forno, a 70°C, durante a noite.

Pesar o tecido residual = ADL

30 Análise de Fibra Detergente Neutra

Preparar as amostras conforme recomendação do protocolo de trituração padrão, sem usar o Triturador Perten Hammer.

Colocar as amostras na balança seca para avaliar o teor de umidade da mistura.

Numerar as sacolas com marcador resistente a solvente.

Registrar o peso das sacolas de amostra seca, vazias, Ankom.

5 Tomar a amostra seca e pesar 0,5 g da amostra seca em sacolas de filtro Ankom.

Vedar as amostras com termovedador.

Dissolver 20 g de Sulfito de Sódio (0,5/50ml de solução de NDF) em 2.000ml de solução de NDF.

10 Ligar o aquecedor até atingir ebulição, uma vez em ebulição adicionar a amostra nas sacolas e cobrir soltamente.

Ajustar o cronômetro para 105 minutos.

Depois de decorrido esse tempo, verter as amostras em um equipamento para filtrar sobre recipiente de rejeito para NDF.

15 Enxaguar lentamente com 2 litros de água a 85-90°C.

Repetir o processo de enxágüe por um total de três enxágües.

Adicionar água gelada às amostras para auxiliar o resfriamento.

Drenar as sacolas e colocá-las em acetona por três minutos.

20 Espalhar as sacolas e deixar que sequem, no forno está ótimo, depois que a maior parte de acetona tenha saído.

Pesar as sacolas, coletar dados em uma Planilha designada NDF.

DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE REAL *IN VITRO*

25 1. Calibrar a balança e pesar 0,5 g (10,0 g para taxas de digestão) de amostra seca triturada (peneira de 1mm) em frascos Erlenmeyer de 125ml. Preparar 6 amostras-padrão para cada banho usado.

2. Preparar os meios por adição dos ingredientes na ordem abaixo:

Número dos frascos: 24 48 78 110 166

30 Água destilada 500ml 1,00L 1,75 L 2,25 L 3,50 L

Trypticase® Peptona 2,5 g 5,0 g 8,75 g 11,25 g 17,5 g

Solução micromineral 0,125ml 0,25ml 0,438ml 0,563ml 0,880ml

Solução de tampão Rúmen 250ml 500ml 875ml 1,125 L 1,75 L

Solução macromineral 250ml 500ml 875ml 1,125 L 1,75 L

Resazurina 1,25ml 2,5ml 4,38ml 5,63ml 8,80ml

1,00 L 2,00 L 3,50 L 14,50 L 7,00 L

- 5 Misturar e adicionar 40ml por frasco. Os meios devem ser adicionados aos frascos pelo menos 1 hora antes da inoculação, para hidratar as amostras. Aquecer os banhos de água durante a noite.

3. Preparar a solução redutora:

- Adicionar cloridrato de cisteína, H_2O , e NaOH e dissolver. Adicionar $Na_2S \cdot 9H_2O$ e dissolver novamente.

4. Enquanto a solução redutora está sendo misturada, colocar os frascos em banho de água. Colocar os frascos com uma amostra padrão em cada fileira disposta diagonalmente através do banho de água. Adicionar 2ml da solução redutora a cada frasco com pipeta repetidora Eppendorf. Tampar cada frasco com um tubo de descarga de CO_2 . Ligar o CO_2 e permitir que as amostras reduzam (a cor vermelha muda para transparente ou cor de chá), antes da adição do inóculo.

5. Preparar o inóculo:

- Coletar fluido de rúmen e ingesta de animais fistulados 2 horas depois da alimentação (vacas são alimentadas a 7,00 h, coletar às 9,15 h). Manter o fluido em um recipiente térmico, que foi preaquecido com água quente da torneira. Verter água em balde e colocar o plugue de cânula nele para mantê-lo flexível. Formar um túnel através da camada de rúmen para permitir que uma xícara de plástico atinja o rúmen ventral. Colocar uma camada de ingesta sobre o fluido e cobrir com uma tampa para eliminar qualquer espaço com ar. Recolocar os plugues de cânula bem justos. Transportar o fluido para o laboratório e colocá-lo sob CO_2 . Aproximadamente 2 L de fluido não processado são necessários para um conjunto de 166 amostras. Combinar a mistura e ingesta em um misturador Waring de 3,78 litros (1 galão), tomando cuidado para que a descarga de CO_2 continue. Revestir um funil de Buchner de plástico, grande, com uma camada de malha de náilon e passar o inóculo misturado através dela. Espremer bem.

Usar somente digesto pancreático de casseína Trypticase® Peptona (Becton Dickinson BBL N° 4311921).

Número dos frascos: 24 48 78 110 166

Água destilada 48ml 95ml 167ml 261ml 356ml

5 L(+)Cisteína HCl.H₂O 313 mg 625 mg 1,094 g 1,719 g 2,344 g

NaOH 1N 2ml 4ml 7ml 11ml 15ml

Na₂S.9H₂O 313 mg 625 mg 1,094 g 1,719 g 2,344 g

50ml 100ml 175ml 275ml 375ml

10 Passar inóculos através da lã de vidro em um béquero de plástico grande para filtrar partículas pequenas.

O filtrado deve ser também mantido sob CO₂, o tempo todo, Transferir inóculos para uma garrafa que é anexada a um equipamento de pipetar Brinkman de 50mL.

15 Usar um equipamento de pipetar Brinkman, inocular cada frasco removendo primeiro a válvula de Bunsen, injetar 10ml de fluido, e repor a válvula. Esse procedimento descarregará CO₂ em cada frasco e expulsará qualquer O₂ presente. Girar a garrafa contendo fluido de rúmen durante a inoculação para manter as partículas suspensas.

20 6. Vedar os frascos, observar e corrigir quaisquer vazamentos de CO₂, e ajustar a pressão de CO₂ para produzir somente bolhas lentas no manômetro. A temperatura do banho de água durante toda a fermentação deve ser mantida em 40°C (100-102°F). Digerir as amostras por 30 h, a menos que especificado de outro modo. Para interromper a fermentação, remover os frascos do banho e adicionar 20ml de solução de ND com o dispensador automático Unispense. Colocar uma rolha em cada frasco para impedir salpicos, e armazenar as amostras em refrigerador ou efetuar imediatamente o procedimento NDF.

30 7. Lavar o conteúdo dos frascos com 80ml de detergente neutro em um béquero Berzelius de 600ml. Adicionar 0,5 g de sulfito de sódio. Refluxar por 1 hora, cronometrada do início da ebulição. Adicionar aproximadamente 1 colher de chá de areia do mar purificada com ácido (Seesand, Fluka Chemika N° 84880) em cadinhos Gooch limpos. Lavar e enxaguar com água

quente até que a espuma desapareça, e duas vezes com acetona.

Deixar a acetona evaporar por completo, secar os cadinhos durante a noite, a 100°C, calibrar a balança e pesar a quente. Levar as amostras de cinzas a 500°C, por 6 horas, resfriar para 200°C, e transferir para secagem em forno e pesar a quente o cadinho mais a cinza.

5

8. Calcular a digestibilidade real *in vitro* da matéria seca:

$IVTD = [1 - (N - CA)] \times 100$, em que N = cadinho + peso de resíduo de ND, CA = peso do cadinho vazio.

S = peso da matéria seca da amostra

10

9. Calcular a digestibilidade de NDF *in vitro*:

$IVCWD = [1 - ((N - CA) / (S \times F / 100))] \times 100$, em que N = cadinho + peso de resíduo de ND

CA = peso do cadinho vazio

S = peso da matéria seca da amostra

15

F = percentagem de NDF da amostra

10. Calcular as taxas de digestão, preparar um conjunto de 13 amostras a serem incubadas de 0 a 120 horas. Colocar todos os frascos em banhos de água e remover com o tempo. Processar os resíduos como listado acima. Calcular NDF remanescente como percentagem de NDF original para cada amostra. Usar ou um método de regressão não-linear (JMP ou SAS) ou um procedimento de transformada de log, como a seguir: subtrair o resíduo indigerível (~120 horas) de cada fração.

20

Calcular o log natural (ln) de cada ponto e calcular a regressão linear do gráfico.

25

Inclinação dessa linha é a taxa de digestão da fração em questão.

Esse método é uma modificação do procedimento de digestibilidade aparente *in vitro* Tilley-Terry. As etapas 1 a 5 são comuns em ambas as técnicas. Da etapa 5, continuar abaixo com a etapa 6a para o método de Tilley-Terry.

30

6a. Depois de 48 horas de fermentação, adicionar, cuidadosamente, 2ml de HCl a 6N a cada frasco para evitar excessiva formação de

espuma. Isso reduzirá o pH para abaixo de 2. Adicionar 0,5 g de pepsina, e girar para dissolver. Adicionar 1ml de tolueno, recolocar os frascos em banho de água, e incubar por mais 48 horas.

- 7a. Remover os frascos do banho de água e filtrar em papel Whatman Nº 4, 41 ou 54, previamente tarado, sem aplicação de vácuo. Enxaguar o papel de filtro duas vezes por preenchimento com água quente e deixar drenar. Encher o filtro com acetona, deixar drenar e secar a ar. Dobrar os papéis, secar a 100°C, e pesar. Usar um fator de matéria seca, calculado em papéis separados, para corrigir quanto à tara nos papéis usados para filtragem. Brancos separados, contendo inóculos e meios, mas sem amostra, e amostras de forragem padrão devem ser também analisadas.

8a. Calcular a digestibilidade aparente *in vitro* (Tilley-Terry):

IVDMD = $[1 - (R - F) - B] \times 100$, em que R = peso do papel de filtro e do resíduo

- 15 F = peso de filtro de papel
B = peso do branco de amostra

Listagem de Referência

- Goering, H.K e P.J. Van Soest. 1970. Forage and Fiber Analysis. Agricultural Handbook Nº 379. Departamento Norte-Americano de Agricultura.

Tilley, J.M.A. e R.A. Terry, 1963. A two-stage technique of the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br Grassl. Soc. 18:104-111.

2/4/00 M.S. Allen, Dairy Nutrition and Forage Analysis Lab, Michigan State University.

25 Exemplo 3

"Knockouts" Duplos de CAD/COMT

- Co-expressão de constructos de *dsRNAi* para CAD & COMT conduzida pelo promotor OsMADs6 pode ser obtida em um constructo simples. Eventos de milho transgênico contendo tais constructos são produzidos usando o protocolo de transformação estabelecido no Exemplo 1. As seqüências do promotor OsMADs6 e os constructos de RNAi são como apresentados, e as análises estabelecidas acima são usadas para determinar o

teor de lignina, etc. Sabugos com teor reduzido de lignina produzidos usando este método pode ser usado do mesmo modo e para os mesmos propósitos que aqueles produzidos usando os plasmídios da Figura 1 ou 2.

Exemplo 4

5 Uso de Material de Planta com Baixo Teor de Lignina em Conversões de Biomassa

Uma das limitações de converter biomassa em etanol é a necessidade de um pré-tratamento químico severo para separar as fibras da planta que estão "coladas" umas as outras por lignina. O propósito desta invenção é que quanto mais baixo o teor de lignina, mais facilmente as fibras podem ser separadas, pré-tratamento menos severo é usado, menos perda de glicose durante o pré-tratamento, menos enzima requerida para hidrolisar a biomassa e um maior rendimento de álcool. Um exemplo da tecnologia usando sabugo de milho é apresentado, contudo, é óbvio que esse resultado
10 pode ser estendido para outras fontes de plantas. A produção de etanol de biomassa de celulose é discutida por Badger, P.C., Ethanol from cellulose: A general review. pp. 17-21, em J. Janick e A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA., 2002.

Pré-tratamento-sacarificação-fermentação padrão

20 Oito gramas de sabugo finamente triturados são suspensos com 80ml de uma solução a 1% de hidróxido de sódio e aquecidos por 1 hora, a 130°C. O pH é então ajustado para pH 5 e 100 mg de levedura seca mais 20 unidades de papel de filtro (FPU) de celulose são adicionados e deixados fermentar por 20 horas. A cerveja resultante seria analisada quanto ao etanol e a expectativa é de que seriam obtidos em torno de 3% em v/v, como é
25 usualmente obtido da biomassa de fermentação.

Pré-tratamento-sacarificação-fermentação de sabugo com baixo teor de lignina

Oito gramas de sabugo finamente triturados são suspensos com
30 80ml de uma solução a 1% de hidróxido de sódio e aquecidos por 1 hora, a 90°C. O pH é então ajustado para pH 5 e 100 mg de levedura seca mais 15 FPU de celulose são adicionados e deixados fermentar por 20 horas. A cer-

veja resultante seria analisada quanto ao etanol e a expectativa é que mais etanol seria produzido que os sabugos triturados padrão na faixa de cerca de 3% em v/v.

Exemplo 5

5 Análise composicional do sabugo e dados preliminares hidrolíticos.

Análise composicional de sacarídeo de sabugos de milho

Esse exemplo descreve a análise composicional de sacarídeo para glicose, xilose, arabinose, e manose de sabugos de milho com baixo teor de lignina. A principal análise composicional de sacarídeo foi determinada para três variedades de sabugo de milho: CPM913 (Controle de Isolinhagem, genótipo A), CPM914 (mutante BM3, genótipo BM3), e CPM916 (mutante BM3, genótipo B). A composição foi determinada realizando-se hidrólise com ácido forte (H_2SO_4 a 72%), por uma hora, seguida por hidrólise com ácido diluído aquecido (H_2SO_4 a 4%, a 121°C, por 1 hora) e neutralização com carbonato de cálcio. As concentrações de monômeros individuais de sacarídeo foram determinadas via Índice de Refração – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (RI-HPLC). Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

20 Análise composicional de amostras de sabugo em triplicata. Amostras de sabugo não foram analisadas quanto ao teor de ferulato, lignina ou de cinzas.

Análise Composicional, amostras de sabugo					
	glicose	xilose	arabinose	manose	TOTAL
CPM 913	35%	21%	2,9%	0,3%	60%
CPM 914	37%	23%	3,2%	0,3%	60%
CPM 916	39%	23%	2,9%	0,1%	60%
Desvios Padrão					
CPM 913	2,4%	0,2%	0,1%	0,1%	2,4%
CPM 914	3,7%	2,1%	0,0%	0,0%	5,4%
CPM 916	1,1%	0,5%	0,1%	0,0%	0,9%

Hidrólise Enzimática de Sabugos de Milho

Esse experimento foi conduzido para determinar os sacarídeos

produzidos a partir de vários sabugos de milho mediante hidrólise enzimática.

Uma tela de primeira passagem foi iniciada usando altas concentrações de sabugo de milho. O CPM914 e o CPM916 são reduzidos genótipos de lignina A e B, respectivamente. Reações amplas (100 mg de sabugo de milho em pedaços) foram preferidas devido à natureza heterogênea e de curso do substrato – as reações, em geral, foram efetuadas em tubos Eppendorf, em vez de placas de microtitulação. Extratos de enzima de sobrenadantes fúngicos e um coquetel otimizado em fibra de milho foram testados quanto às atividades de hidrólise em três tipos de sabugo. As reações estavam em escala de 1ml contendo a) 100 mg de sabugo em pedaços, suplementados com b) 50 µg de enzimas fúngicas de *Cochliobolus heterotrophus* ("cokie") e 200 µg de enzimas de *Aspergillus niger*, d) um coquetel de xilanase-esterase contendo 2 xilanases, uma α -arabinofuronosidase, uma β -xilosidase, um ácido ferúlico esterase e um acetil xilano esterase. O coquetel de xilanase continha: 25 µg de BD13509, 125 µg de BD2157, 62,5 µg de BD13715 e BD13457. O coquetel de esterase continha: 100 µg de BD14441 e BD14104.

Os resultados são apresentados na Tabela 4. Quando foi usado o coquetel de enzimas definido, a hidrólise foi mais alta em ambas as variedades de sabugo com lignina reduzida em comparação ao sabugo de variedade regular. Embora o coquetel de xilanase-esterase não tenha sido otimizado para hidrólise de sabugo, o coquetel apresentou uma atividade surpreendentemente alta em sabugo, com melhor atividade nos mutantes de lignina inferiores. Note que não existem enzimas de degradação de celulose presentes no coquetel de enzimas: se essas enzimas forem adicionadas, pode ser possível aumentar ainda mais a hidrólise dos sabugos.

Tabela 4

Hidrólise enzimática de três variedades de sabugo de milho em pedaços para monômero de açúcar, expresso em porcentagem de peso seco.

	Ponto de tempo de 48 horas, carga de 10% de fibras				
	glucobiose	glicose	xilose	arabinose	Total
Controle de CPM913	0%	2,1%	0%	0%	2,1%
"Cokie" induzido por fibra	0%	3,7%	0,9%	0,1%	4,7%
"Cokie" + 200 µg de enzima fúngica	0,1%	9,3%	7,7%	0,5%	17,6%
Coquetel de xilase-esterase	1,0%	2,9%	5,7%	0%	9,6%
Açúcar disponível CPM913		35,5%	20,9%	2,9%	59,8%
Controle de CPM914	0,3%	2,9%	0%	0%	3,2%
"Cokie" induzido por fibra	0,1%	3,1%	0,5%	0%	3,7%
"Cokie" + 200 µg de fibra	0%	7,1%	8,5%	0,7%	16,3%
Coquetel de xilase-esterase	1,2%	3,1%	8,5%	0%	12,8%
Açúcar disponível CPM914		37,0%	23,4%	3,2%	64,1%
Controle de CPM916	0%	2,9%	0%	0%	2,9%
"Cokie" induzido por fibra	0,2%	3,2%	0,5%	0%	3,9%
"Cokie" + 200 µg de enzima fúngica	0,1%	7,9%	10,8%	0%	18,9%
Coquetel de xilase-esterase	0,8%	2,4%	6,8%	0,2%	10,2%
Açúcar disponível CPM916		38,8%	22,8%	2,9%	64,8%

Ponto de tempo de 48 horas, carga de 10% de fibras
glucobiose glicose xilose arabinose Total
coquetel de xilanase: 25 µg de BD13509, 125 µg de BD2157 e BD13457, 62,5 µg de BD 13715
coquetel de esterase: 100 µg de BD14441 e BD14104
Enzimas de "cokie" adicionadas em 50 µg

Hidrólise enzimática de sabugos de milho incluindo também glicanases, celulasas e glicuronidase

A relação positiva entre os coquetéis de enzimas definidas e CPM913/CPM914 foi ainda explorada, desta vez adicionando outras glicanases, celulasas, e uma glicuronidase. As reações de hidrólise estavam em escala de 1 ml, 25 mg/ml de sabugo de milho em pedaços incubados por 48 horas, a 37°C, em um agitador de tubo Eppendorf. O coquetel de xilanase-esterase é o mesmo que o do Exemplo 2 (10ml de coquetel de xilanase: 4ml de 13509, 20 µg de 2157, 10 µg de 13715 e 13457). Enzimas adicionais foram adicionadas ao coquetel: 10 µg de α-Glicuronidase BD12669; 100 µg de coquetel de celulose de *Trichoderma reesi*; 10 µg de glicanase COM516; glicanase com coquetel de esterase (10ml de coquetel de esterase: 100 µg de BD14104 e 100 µg de BD14441); ou um coquetel contendo todas as acima (exceto a α-Glicuronidase). Com coquetéis de enzimas definidos, o substrato de sabugo de milho de baixo teor de lignina é mais suscetível ao ataque enzimático. A adição de um extrato de celulose aumenta a hidrólise global para 21,8%, ou 34% do total de açúcar disponível. Uma reação similar usando fibra de milho rende 5,4%, um substrato para o qual as enzimas foram otimizadas.

A mesma tendência de melhor digestibilidade foi vista nas amostras de sabugo com baixo teor de lignina (Tabela 5). De particular interesse foi a habilidade de esterases e celulasas em aumentar a quantidade de xilose hidrolisada no sabugo de baixo teor de lignina. Uma combinação de coquetel de xilanase e celulasas foram capazes de converter 34% da açúcar disponível em monômero no sabugo de baixo teor de lignina, em comparação a somente 25% no sabugo do tipo selvagem.

Tabela 5

É mostrada por referência a hidrólise de dois tipos de sabugo em pedaços usando coquetéis de enzimas definidos – fibra de milho não tratada. Os números são expressos como porcentagem de peso seco.

Sabugo de milho em pedaços (genótipo A de controle de isolinhagem)				
	Glicose	Xilose	Arabinose	TOTAL
Controle	2,8%	0%	0%	2,8%
coquetel de xilanase	3,5%	3,7%	0,2%	7,4%
xilanase com esterase	2,9%	3,4%	0,2%	6,5%
coquetel de X-E com a-Gln	2,8%	3,8%	0,2%	6,8%
xilanase com celulase	11,4%	3,8%	0,3%	15,5%
glicanase CPM516	2,5%	0,0%	1,3%	3,8%
CPM516 com esterase	2,4%	0%	0%	2,4%
CPM516-X-E com celulase	9,3%	4,4%	0,2%	13,9%
Açúcar disponível CPM914	35%	21%	3%	60%

Sabugo de milho em pedaços com baixo teor de lignina (genótipo A de mutante BM3)				
	Glicose	Xilose	Arabinose	TOTAL
Controle	3,0%	0%	0%	3,0%
coquetel de xilanase	2,6%	3,8%	0,2%	6,6%
xilanase com esterase	3,1%	5,7%	0,2%	9,0%
coquetel de X-E com a-Gln	3,2%	5,6%	0,3%	9,0%
xilanase com celulase	13,0%	8,5%	0,3%	21,8%
glicanase CPM516	3,0%	0%	0%	3,0%
CPM516 com esterase	3,0%	0%	0%	3,0%
CPM516-X-E com celulase	13,4%	8,8%	0,3%	22,5%
Açúcar disponível CPM914	37%	23%	3%	64%

Fibra de milho não tratada (com 20% de amido aderente)				
	Glicose	Xilose	Arabinose	TOTAL
Controle	2,6%	0%	0%	2,6%
coquetel de xilanase	2,7%	0,2%	0,4%	3,3%
xilanase com esterase	2,9%	0,2%	0,3%	3,4%
coquetel de X-E com α -Gln	3,0%	0,3%	0%	3,3%
xilanase com celulase	4,7%	0,3%	0,4%	5,4%
glicanase CPM516	2,9%	0%	0,4%	3,2%
CPM516 com esterase	2,9%	0%	0%	2,9%
CPM516-X-E com celulase	4,5%	0,3%	0,3%	5,1%
Açúcar disponível CPM711	44%	19%	10%	76%

O benefício da digestibilidade aperfeiçoada de ensilagem de milho na ingestão de matéria seca e produção de leite em vacas leiteiras foi demonstrado por Ballard et al., J. Dairy Sci. 84:442-452 (2001), e por Oba e Allen, J. Dairy Sci. 82:135-142 (1999). Experiências similares de alimentação são estabelecidas para uso de sabugos de milho com baixo teor de lignina da presente invenção para demonstração de benefícios similares que resultam da digestibilidade aperfeiçoada demonstrada acima, e como mostrada na Figura 3.

10 Certas seqüências são particularmente úteis na prática da presente invenção. Essas seqüências são mostradas a seguir:

SEQ ID No: 1. Seqüência de Promotor: OsMADS 6

ctaggacgatggtgatgtgggaacacgaagaaacatgaggaaaaatataaatgaattccacttaaaatgcatcaaat
 aaaaaaataaagaaacgacgggaatagacacagggttgaactagclagggcaaacatcatatggccttctgatgca
 caagtacattgagatgtcattcaattctgtcatcatatgcatgtgctccttctgaatattactcttgaatatctaccagtccaatct
 attgcatgacttaattaattcacagggttgtgattacattattagtaagcttgagagcacaagctcaatggattttctataaatgggat
 cttttgcaattttcttctgtgcaaagttagcctcttattactactctgttttaaatatacgatcctattgacttttggtcatatattaacca
 tgtatcttattagatagttgcgcaaatatataacctcaatgataaaattagttacaatgaaacaaatgatattacgcaattcttttac
 taaacaagtcacaagaagtacctgcagcaatatagttggaaccgtgcagtagatcgagcctagctacgcaaaaaacaaaa
 gagaaaaaagggaaggaaaaacattaatcatgcatgagcagtagtccccggcaactggaattgtcaagatatggggaga
 ggagaataatacaagtagtactactactacgtatcatatgcacccaaggcaactggattattggataaagcacagat
 gctggcaaaacaatccttaagcctccctcctgctcttattttgggcagcctctaccggacggtgccgtggtcattggaccagta
 ggtggcgacatacatggtttgggttaagctaggagagcagtggtgtgtgcgcgcgcaagagagagagactgtgagctgggagta
 gccctctccctcctttggccatcttctctgtatatagcataatgcacatcgcaacggtgtatattgtggtgtggcggtgtggcattg
 gattgccccattttggctcgtgcttccagttagggtaaaacctgtggttaaactgtctagccccacgccaagttaccttcttattgtt

[illegible]

SEQ ID NO: 2 Sequência de RNAi de CAD K/O (pSyn 12210)

CAD-Frente

gtaaaatctagctctttgtttgtttggcaattcccgttaagtataagattatgtggataacattataactttcaagatccaatccac
atctttgatitgaaaaatcatacaatagggaataacatgaagggtaattagatgctatagcatatataatataatgtgcgcgcgc
gcgcgcctgaatttaacatglatgcatccaactglttcattgaaaaagattgatattttcagctctattcttttcgagtatataatfaatatg
ttcaatctgtttgaccattataagataaagccatattcaccaggcatttgagatgaicttttcatgcatgaaaaagctgtgttatcactt
caactaaccagacgatclaacatgtattgtataagaacagaccttgatttctctgtaaaaatcatgcatgtgttcgtttgaattgga
gtcggcgcgctgtgtttgaccgtcaggaaagcttttttccctgaatagtcagggtctatacttcttgaagcaattgggacactaat
caattattgtttataacctcggaccatcttttctcttcacaccactaatcagtttatgcttggaccalttaattgtgtgttgcacaagcttctgt
ttatggtttacaaagcattcgcctagatttgtgtgtgtctctacacatcgatcacittaaatacttgcgcttcagttattcttttaacgtttgt
tatttacttatttaaaaaaattatcgtattattattattttgtttgtgatttactttattatcaaaagtatttcaaatatgacttattctttttataagt
gcactaattttcaaaataagatgaatgggtcaaatgttacaagaaaaagttaaagcaaccactaatattaggcgaggtagtaaaac
ctagttattglaaccaataattttatcaatctataaatgcaacacaaagtcacttcgtgatatctcacacaaagccacttcaacgatga
aagctgactgcatgtttatcaaaacacatgtgatcagtttgttggtgataaaaaaattatctatgtcataaatcaagagttataatataa
gctctggctctacaagtaacatttctatgtttttttacgttcttataatactatgttttgcacaaaaaacatgatcatttgttgacgaaa
agaaatagtaaatatagagtgacctttgalatcattalaataaagcttctgcctctataaataacatctatgcacttttacgctgtagta
atttgatatatgagaaattacatatataacatttttgcagcataaccacc

SEQ ID NO: 3. Sequência de RNAi de COMT/KO (pSyn 12345)

COMT-Frente

5'atggggagcctggcgctccgagaggaagggtggcgggtgggcccagggagcggcaccggacacctctccccctactcttac
accctcaggaacacagggccctgaagatgtggtggtgaagggtgctctactgcgggatctgccacggacatccaccaggccaa
gaaccacctcggggcttcaaagtatcctatggtccctgggcacgaggtggtcggcgaggtggtggaggtcgggcccagggtggc
caagtacggcgctcggcgacgtggtaggcgicggggtgatcgttgggtgctgccgcgagtgagccccctgcaaggccaacgttga
gcagtactgcaacaagaagatctggtcatacaacgacgtctacactgatggacggcccacgcagggtggattcgccctc 3'

- Embora a invenção acima tenha sido descrita em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para propósitos de clareza e entendimento, ficará claro para aqueles versados na técnica que certas alterações e
- 5 modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações apenas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar a biossíntese de lignina em uma planta transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão de uma enzima na planta, a enzima selecionada do grupo que consiste em CAD e COMT, em que a infra-regulação é obtida usando RNAi de filamento duplo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a planta é milho.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que a infra-regulação está localizada no sabugo da planta de milho.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o constructo de RNAi de filamento duplo compreende a SEQ ID NO:2.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o constructo de RNAi de filamento duplo compreende SEQ ID NO:3.

6. Método para controlar a biossíntese de lignina em uma planta transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão dos genes de CAD e COMT de uma planta usando RNAi de filamento duplo.

7. Constructo de RNAi selecionado do grupo que consiste na sequência SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3.

8. Método para controlar a biossíntese de lignina nos sabugos de uma planta de milho transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão do gene de CAD, do gene de COMT, ou de ambos os genes, nos sabugos da planta de milho usando um ou mais constructos de RNAi de filamento duplo, cuja expressão está sob o controle de um promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que o promotor é o promotor de SEQ ID NO:1.

10. Método para controlar a biossíntese de lignina nos sabugos de uma planta de milho transformada, em que o método compreende infra-regular a expressão do gene CAD, do gene COMT, ou de ambos os genes, nos sabugos da planta de milho usando um ou mais constructos de RNAi de filamento duplo compreendendo SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, ou ambas, em que os constructos são conduzidos pelo promotor de SEQ ID NO:1.

11. Método para a produção de etanol, em que o método compreende o uso de biomassa compreendendo material de um sabugo de milho de baixo teor de lignina produzido pelo método como definido na reivindicação 8, em um processo de produção de etanol.

5 12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que o sabugo de milho com baixo teor de lignina é produzido pelo método como definido na reivindicação 10.

10 13. Método para aumentar a produção de leite em um animal pela alimentação do animal com uma ração que compreende material proveniente de sabugo de milho com baixo teor de lignina, produzido pelo método como definido na reivindicação 8.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, em que o sabugo de milho com baixo teor de lignina é produzido pelo método como definido na reivindicação 10.

15 15. Método para aumentar o rendimento nutricional da ração de um animal através da alimentação do animal com uma ração que compreende material proveniente de um sabugo de milho de baixo teor de lignina produzido pelo método como definido na reivindicação 8.

20 16. Método, de acordo com a reivindicação 15, em que o sabugo de milho com baixo teor de lignina é produzido pelo método como definido na reivindicação 10.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS E CONSTRUCTOS GENÉTICOS PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO"**.

- 5 A presente invenção refere-se a métodos e constructos genéticos para o controle de expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina em plantas. O método envolve o uso de RNAi de filamento duplo para infra-regular ou nocautear a expressão dos genes CAD e COMT. Em modalidades particulares, o método envolve o uso de promotores específicos para
- 10 sabugo e preferidos para sabugo para infra-regular a biossíntese de lignina nos sabugos de plantas de milho.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO, MÉTODO PARA USAR SABUGOS DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA EM APLICAÇÕES DE CONVERSÃO DE BIOMASSA, E MÉTODO PARA AUMENTAR O RENDIMENTO NUTRICIONAL DA RAÇÃO DE UM ANIMAL".

5 Reivindicação de Prioridade

Este pedido reivindica a prioridade do pedido de Patente US60/665.685, depositado em 28 de março de 2005, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência.

10 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia agrícola. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao uso de tecnologia de RNAi para modificar a expressão de genes envolvidos na biossíntese de lignina no milho, e mais especificamente em sabugos de milho.

15 Antecedentes da Invenção

Lignina é um polímero aromático heterogêneo complexo que torna as membranas impermeáveis e reforça as paredes de certas células das plantas.

Lignina é formada por polimerização de radicais livres derivados de monolignóis, tais como álcoois paracumarílicos, coniferílicos e sinapílicos (Higuchi, 1985, em Biosynthesis and degradation of wood components (T. Higuchi, ed.), Academic Press, Orlando, Fla. pp. 141-160). A lignina é formada por polimerização de pelo menos três monolignóis diferentes que são sintetizados em uma via de multietapas, em que cada etapa na via é catalisada por uma enzima diferente.

25 Tem sido mostrado que a manipulação de várias cópias de genes que codificam certas enzimas, tais como álcool cinamílico desidrogenase (CAD) e ácido caféico 3-O-metiltransferase (COMT) resulta na modificação da quantidade de lignina produzida; vide, por exemplo, Patente US Nº 5.451.514 e Publicação de PCT WO 94/23044. Além disso, tem sido mostrado que a expressão anti-sentido de se-

30 qüências que codificam CAD em choupo leva à produção de lignina tendo uma composição modificada (Grand, C, et al., Planta (Berl.) 163:232-237 (1985)).

Ligninas têm uma ampla variação em seu conteúdo relativo de

71).

Uma tecnologia promissora para obtenção de silenciamento de gene marcado é baseada em RNA de filamento duplo (dsRNA) que induz reposta ao chamado silenciamento de gene pós-transcricional ou de interferência de RNA (RNAi). RNA de filamento duplo foi introduzido em várias espécies diferentes, incluindo nematódeos, moscas de frutas, *Trypanosoma*, fungos, plantas. Vide, por exemplo, WO9932619. Algum sucesso limitado tem sido também demonstrado em mamíferos, especificamente em oócitos e embriões de camundongo. A introdução do dsRNA apropriado inibe a expressão de gene em um modo dependente de sequência, um efeito que tem sido usado extensivamente em *C. elegans* e em *D. melanogaster* como uma ferramenta genética para estudar a função do gene. Por exemplo, 00/01846 descreve métodos para caracterizar a função do gene usando inibição de dsRNA. Contudo, a inibição de dsRNA tem sido aplicada com pouco sucesso em sistemas de mamíferos.

Por causa da importância das ligninas na arquitetura da parede celular e digestibilidade, e por causa da agronomia desfavorável de milho Bmr, há considerável interesse nos prospectos para alterar a quantidade ou a qualidade de lignina por engenharia genética. Assim, há um grande acordo de interesse na identificação dos genes que codificam proteínas envolvidas na produção de lignina em plantas e na modificação da expressão de tais genes, por exemplo, pelo uso de métodos de RNAi. Esses métodos podem ser usados em células de planta para controlar a produção de lignina. Tais métodos teriam significativa utilidade na produção de material de planta com aperfeiçoada digestibilidade, e se direcionados ao decréscimo do teor de lignina dos sabugos de milho, poderiam evitar o aspecto inferior agrônomico do fenótipo de Bmr.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona métodos e constructos de expressão genética úteis no controle da biossíntese de lignina em plantas, e particularmente em milho, e mais particularmente nos sabugos das plantas de milho. Em um exemplo específico, a tecnologia de RNAi de fita dupla é

utilizada para diminuir a expressão de (ou para nocautear) tanto os genes de álcool cinamílico desidrogenase (CAD) do milho como os genes de ácido caféico O-metil transferase (COMT) do milho. Modalidades preferidas envolvem os genes nocaute CAD ou COMT especificamente no sabugo de milho para reduzir o teor de lignina. Isso proporcionará digestibilidade aperfeiçoada de fibra não digerível no sabugo, que aperfeiçoaria a digestibilidade da planta inteira por ruminantes. Limitando a expressão das características similares a BM somente ao sabugo, o tecido mais altamente lignificado, proporcionaria ainda aumento atrativo na digestibilidade da planta toda, mas mitigaria a maior parte do risco associada ao pobre desempenho agronômico, tais como depósitos aumentados e pobre rendimento de matéria seca, como ocorre com mutações de Bmr, que está associado à sua expressão sistêmica. Portanto, os eventos de nocaute de CAD ou de COMT foram gerados usando tecnologia de RNAi de fita dupla com OsMAD6, um promotor específico de sabugo.

A presente invenção refere-se a um método para controlar a biossíntese de lignina em uma planta, em que o método compreende regular negativamente (daqui por diante também referido como infra-regular) a expressão de uma enzima na planta, a enzima selecionada do grupo que consiste em CAD e COMT, em que a regulação negativa (daqui por diante também referido como infra-regulação) é obtida usando RNAi de fita dupla. O método refere-se também à infra-regulação de expressão de ambas as enzimas; às construções de dsRNAi; e às construções específicas para sabugo/preferidas para sabugo. A presente invenção refere-se também ao uso dos sabugos, com baixo teor de lignina, produzidos utilizando o método da invenção em aplicações de conversão de biomassa (por exemplo, na produção de etanol) e em aplicações de ração (por exemplo, em ração de animal para produção aumentada de leite, particularmente vacas leiteiras).

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é uma representação do plasmídeo pSyn12210.

A figura 2 é uma representação do plasmídeo pSyn12345.

A figura 3 é um gráfico mostrando que conforme o teor de lignina aumenta, a digestibilidade de material de sabugo diminui.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para controlar a biossíntese de lignina nos sabugos uma planta de milho transformada, caracterizado pelo fato de que compreende regular negativamente a expressão do gene de CAD, do gene de COMT, ou ambos os genes, cuja expressão está sob o controle de um promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é de um gene que codifica uma proteína que compreende um domínio MADS box.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a regulação negativa da expressão do gene de CAD, do gene de COMT ou de ambos os genes usa um ou mais construtos de RNAi de filamento duplo.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é um promotor de arroz.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é um promotor OsMADS.

6. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o um ou mais construtos de RNAi de filamento duplo compreendem SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, ou ambas.

7. Método para usar sabugos de milho com baixo teor de lignina em aplicações de conversão de biomassa caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) fornecer sabugos de uma planta de milho transgênica infra-regulada para a expressão do gene de CAD, do gene de COMT, ou ambos, cuja expressão está sob o controle de um promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo; e

b) usar os sabugos em uma aplicação de conversão de biomassa.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo

fato de que o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é de um gene que codifica uma proteína que compreende um domínio MADS box.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a expressão infra-regulada do gene de CAD, do gene de COMT, ou de ambos os genes usa um ou mais construtos de RNAi de filamento duplo.

10 10. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é um promotor de arroz.

11. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é um promotor OsMADS.

15 12. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o um ou mais construtos de RNAi de filamento duplo compreendem SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, ou ambas.

20 13. Método para aumentar o rendimento nutricional da ração de um animal caracterizado pelo fato de ser através da alimentação do animal com uma ração que compreende sabugos de uma planta de milho transgênica infra-regulada para a expressão do gene de CAD, do gene de COMT ou ambos, cuja expressão está sob o controle de um promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo.

25 14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o promotor é de um gene que codifica uma proteína que compreende um domínio MADS Box.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a expressão infra-regulada do gene de CAD, do gene de COMT, ou de ambos os genes usa um ou mais construtos de RNAi de filamento duplo.

30 16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é um promotor de arroz.

17. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o promotor específico para sabugo ou preferido para sabugo é um promotor OsMADS.

- 5 18. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o um ou mais construtos de RNAi de filamento duplo compreendem SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, ou ambas.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE LIGNINA DE SABUGOS DE MILHO, MÉTODO PARA USAR SABUGOS DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA EM APLICAÇÕES DE CONVERSÃO DE BIOMASSA, E MÉTODO PARA AUMENTAR O RENDI-**
 5 **MENTO NUTRICIONAL DA RAÇÃO DE UM ANIMAL"**.

A presente invenção refere-se a métodos e constructos genéticos para o controle de expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de lignina em plantas. O método envolve o uso de RNAi de filamento duplo para
 10 regular negativamente ou nocautear a expressão dos genes CAD e COMT. Em modalidades particulares, o método envolve o uso de promotores específicos para sabugo e preferidos para sabugo para regular negativamente a biossíntese de lignina nos sabugos de plantas de milho.