



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

(21) **PI0709783-2 A2**



(22) Data de Depósito: 09/05/2007
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82 2006.01

(54) Título: **PLATAFORMAS DE CROMOSSOMOS ARTIFICIAIS DE PLANTA VIA TRUNCAGEM DE TELÔMERO**

(30) Prioridade Unionista: 09/05/2006 US 60/798,830,
24/10/2006 US 60/862,733

(73) Titular(es): The Curators of the University of Missouri

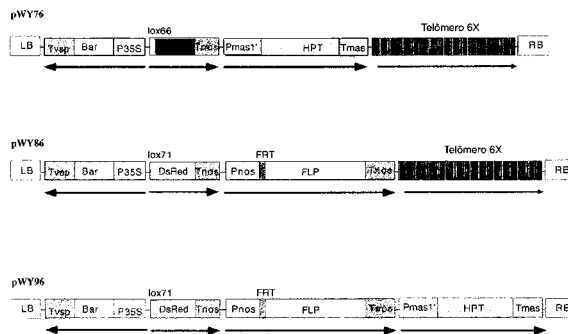
(72) Inventor(es): James Birchler, Juan M. Vega, Weichang Yu

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007068589 de 09/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/134122 de 22/11/2007

(57) Resumo: PLATAFORMAS DE CROMOSSOMOS ARTIFICIAIS DE PLANTA VIA TRUNCAGEM DE TELOMEROA presente invenção refere-se a minicromossomos de planta elaborados que são gerados por truncagem mediada por telômero de cromossomos nativos. Esses minicromossomos são fielmente transmitidos de uma geração à próxima e fornecem uma plataforma ideal para a criação de genes em variedades desejadas de plantas sem problemas, tal como arrastada ligação, associada com métodos de criação padrão.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PLATAFORMAS DE CROMOSSOMOS ARTIFICIAIS DE PLANTA VIA TRUNCAGEM DE TELÔMERO**".

5 Este pedido reivindica a prioridade do Pedido de Patente Provisória U.S. Nº Serial 60/798,830, depositado em 9 de Maio de 2006, e do Pedido de Patente Provisória U.S. Nº Serial 60/862,733, depositado em 24 de Outubro de 2006, as descrições inteiras dos quais são especificamente incorporadas aqui por referência.

Campo da Invenção

10 A invenção refere-se aos campos de biologia molecular e genética de plantas. Mais especificamente, a invenção refere-se a plataformas de minicromossomo artificial de planta e métodos para sua produção e uso.

Descrição da Técnica Relacionada

15 A manutenção e a herança de cromossomos em um organismo tipicamente exigem três elementos essenciais: origens de replicação, um centrômero e telômeros, como previamente identificados com cromossomos artificiais de levedura. Murray e Szostak (1983), por exemplo, descreveram um sistema de clonagem baseado na construção in vitro de cromossomos artificiais de levedura lineares. Entretanto, nenhum dos elementos de ácido
20 nucléico que foram identificados é suficiente para manter cromossomos artificiais em sistemas eucarióticos multicelulares.

Um método para gerar um cromossomo artificial é por construção de novo, isto é, conjunto de centrômeros, telômeros e marcadores selecionáveis e reintrodução em plantas (Patente U.S. Nº 7.015.372). Entretanto,
25 os cromossomos são conhecidos como tendo um limite de tamanho mínimo para eficiente transmissão através de meiose (Schubert, 2001). Embora a maior parte dos minicromossomos mamíferos de novo possa transmitir durante mitose, a transmissão de tais minicromossomos em linhas genéticas não foi relatada. Os únicos cromossomos artificiais de novo transmitidos de
30 forma meiótica em eucariotes até agora são cromossomos artificiais de levedura (Murray e Szostak, 1983; Murray e Szostak, 1986). Adicionalmente, foi indicado que centrômeros de plantas necessitam ser maiores do que apro-

ximadamente uma megabase em tamanho para transmissão normal (Kaszas e Birchler, 1998) e esse tamanho é maior do que pode atualmente ser montado in vitro.

Em contraste, alguns cromossomos truncados com centrômeros nativos são transmissíveis através de meiose (Shinohara e outros, 2000; Tomizuka e outros, 1997, 2000; Voet e outros, 2001; Shen e outros, 1997, 2000; Schubert, 2001; Zheng e outros, 1999; Kato e outros, 2005; McClintock, 1938; Brock e Pryor, 1996; Nasuda e outros, 2005). Um método para truncar cromossomos que foi aplicado em sistemas de mamíferos é truncagem mediada por telômero (Farr e outros, 1991, 1992, 1995; Barnett e outros, 1993; Itzhaki e outros, 1992; Heller e outros, 1996; Mills e outros, 1999; Saffery e outros, 2001). Entretanto, nenhum método para truncagem mediada por telômero de cromossomos de plantas foi descrito até agora.

Outros métodos de apagar cromossomos foram aplicados a sistemas de plantas. Por exemplo, cromossomos de milho alterados foram gerados por raio X ou irradiação gama de pólen de milho (McClintock, 1938; Brock e Pryor, 1996) ou através de uma translocação B-9 com 9S duplicado (Zheng e outros, 1999; Kato e outros, 2005). Entretanto, cromossomos alterados criados por esses métodos careciam de transmissão estável durante meiose ou mitose, não carregam sítios de recombinação específica em sítio, não habilitaram expressão eficiente de seqüências heterólogas ou foram difíceis de produzir. Assim, permanece uma grande necessidade na técnica por métodos para produzir e usar minicromossomos de planta.

Sumário da Invenção

A invenção supera limitações na técnica fornecendo minicromossomos de planta que podem ser eficientemente transmitidos através de mitose e meiose. O termo "minicromossomo" refere-se a cromossomos criados por engenharia feitos apagando partes de um cromossomo nativo. Assim, os minicromossomos são distintos de cromossomos artificiais feitos de novo por técnicas de DNA recombinante. Em modalidades específicas, os minicromossomos de planta descritos aqui são fornecidos derivados de um cromossomo de planta nativo de partida que é truncado pela inserção de

repetições de telômero. Assim, os minicromossomos de planta da invenção podem ser definidos como compreendendo pelo menos um braço de cromossomo que foi truncado. Em algumas modalidades adicionais, um minicromossomo de planta é truncado em ambos os braços. Um minicromossomo de planta pode, em alguns aspectos, ser eficientemente transmitidos durante mitose e meiose em uma planta que é a mesma espécie da planta do cromossomo de partida. Um versado na técnica entenderá que tais minicromossomos geralmente compreendem um centrômero funcional e origens de replicação, ambos os quais permitem manutenção fiel.

10 Em um aspecto da invenção, um minicromossomo de planta compreende um centrômero nativo. Os centrômeros nativos são encontrados em cromossomos endógenos e são compreendidos de repetições de centrômeros (Jiang e outros, 2003). Essas seqüências fornecem segregação eficiente de cromossomos durante a divisão celular tal como mitose e meiose. Assim, em certos aspectos da invenção, um minicromossomo de planta é definido como compreendendo uma seqüência de centrômero de planta nativo. Em modalidades adicionais, um minicromossomo da invenção pode ser definido como não compreendendo um neocentrômero.

Um minicromossomo pode adicionalmente compreender seqüências de telômero criadas por engenharia. Como usado aqui, o termo "seqüência de telômero criadas por engenharia" refere-se à seqüências de telômero que estão em um contexto diferente daquelas encontradas em um cromossomo nativo. Por exemplo, as seqüências de telômero criadas por engenharia em minicromossomos da invenção podem estar mais próximas ao centrômero do minicromossomo se comparado a um telômero nativo. Por exemplo, em um minicromossomo de planta da invenção, uma seqüência de telômero criada por engenharia pode ser definida como aproximadamente 10 kb a aproximadamente 10 Mb do centrômero da seqüência de cromossomo nativo. Em modalidades mais específicas, um telômero criado por engenharia pode ser aproximadamente 10 kb a aproximadamente 5 Mb ou aproximadamente 100 kb a aproximadamente 1, 2, 3, 4 ou 5 Mb a partir do centrômero de uma seqüência de cromossomo nativo. Os minicromossomos de planta

da invenção podem adicionalmente compreender duas seqüências de telômero criadas por engenharia, que podem ser distâncias diferentes do centrômero do minicromossomo.

As seqüências de telômero criadas por engenharia podem ser de uma variedade de fontes. Por exemplo, as seqüências de telômero criadas por engenharia podem ser da mesma espécie de planta ou variedade como as seqüências de cromossomos nativos ou de uma espécie de planta diferente relativa às seqüências de cromossomos nativos. Por exemplo, as seqüências de telômero podem ser as seqüências de telômero clonadas de pAtT4 compreendendo repetições diretas do motivo telomérico tipo *Arabidopsis*, TTTAGGG (SEQ ID NO:1), ou derivados desses (Richards e Ausubel, 1988). Nesse caso, cada repetição compreende 430 pares base de seqüências teloméricas. As seqüências de repetição de telômero criadas por engenharia podem ser de milho, trigo, aveia, arroz, *Arabidopsis* e soja. O versado na técnica entenderá que os telômeros criados por engenharia podem compreender uma pluralidade de seqüências de repetição de telômero. Por exemplo, em certas modalidades, um telômero criado por engenharia da invenção pode compreender entre 2 e 100, 2 e 50 ou 2 e 10 repetições, incluindo 6 repetições. Em algumas modalidades da invenção, as seqüências de telômero em um vetor de truncagem de telômero tal como aqueles exemplificados aqui (por exemplo, pWY76, pWY86 e pJV21) são fornecidas. Em uma modalidade da invenção, um vetor de truncagem de telômero pode ser empregado para gerar um minicromossomo truncado. O vetor de truncagem de telômero pode ser empregado para gerar um minicromossomo truncado. O vetor de truncagem de telômero pode ser compreendido no minicromossomo ou pode ser separado dele. Em uma modalidade da invenção, o vetor de truncagem de telômero pode ser apagado durante a geração do minicromossomo. Um transgene poderia então, por exemplo, ser introduzido no minicromossomo para gerar um minicromossomo compreendendo um ou mais transgene(s) adicionado(s). Um minicromossomo formado por tais métodos compreende uma modalidade da invenção.

Um aspecto de minicromossomos de planta é seu tamanho. Os

minicromossomos descritos aqui preferencialmente codificam um número mínimo de genes endógenos que podem afetar perigosamente o fenótipo de uma planta compreendendo o minicromossomo. Assim, pode ser preferencial que uma parte grande de um cromossomo endógeno seja apagado para
5 fazer um minicromossomo, enquanto mantendo um tamanho suficiente para transmissão estável. Isso pode ser importante quando o cromossomo nativo é um cromossomo A. Os cromossomos B não codificam tipicamente funções essenciais e, portanto, podem ser menos prováveis para criar fenótipos perigosos. Contudo, pode-se observar que os minicromossomos que são muito
10 pequenos não são fielmente mantidos através de mitose e meiose. Assim, em certas modalidades da invenção, um minicromossomo de planta compreende uma seqüência de cromossomo de planta nativo onde aproximadamente 1 a aproximadamente 99,9 por cento da seqüência de cromossomo nativo é apagada. Em algumas modalidades, aproximadamente 10, 20, 25,
15 35, 50, 75, 85, 90, 93, 95, 97, 99, 99,5 ou 99,9 por cento ou qualquer faixa derivável nesta da seqüência de cromossomo nativo é apagada em um minicromossomo.

Em certos aspectos adicionais da invenção, um minicromossomo de planta pode ser definido por seu tamanho. Por exemplo, um minicromossomo de planta pode ser definido como aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 ou 30 Mb em tamanho. Em modalidades adicionais, um minicromossomo de planta pode ser aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7,0, 9, 10, 20, 50 ou 100 Mb em tamanho ou qualquer faixa derivável nesta. Por exemplo, em alguns casos, os minicromossomos de planta descritos aqui
25 estão entre aproximadamente 1 e 10 Mb ou entre aproximadamente 5 e 10 Mb em tamanho.

Em alguns aspectos da invenção, um minicromossomo de planta pode ser definido como sendo transmitido através de mitose com uma freqüência de 100%. Em casos adicionais, um cromossomo de planta é definido
30 do pela freqüência com a qual ele é transmitido durante meiose. Por exemplo, um minicromossomo de planta pode ser transmitido com mais do que aproximadamente uma freqüência de 10%, 20%, 25% ou 30% durante meio-

se (50% sendo transmissão perfeita). Assim, um cromossomo de planta da invenção pode compreender um cromossomo A ou B truncado que é transmitido com mais do que 35% de frequência durante meiose quando o minicromossomo é transmitido em uma planta da mesma espécie do cromossomo de partida.

Uma variedade de plantas pode ser usada para obter minicromossomos de planta de acordo com a invenção. Em algumas modalidades, a planta é definida como uma planta dicotiledônea ou monocotiledônea. Por exemplo, a planta pode ser alfafa, *Tripsacum*, milho, canola, arroz, soja, tabaco, gramado, aveia, centeio, *Arabidopsis* ou trigo. Em certos aspectos da invenção, o minicromossomo pode ser definido a partir de planta milho.

Em modalidades adicionais, um minicromossomo de planta da invenção pode ser derivado de um cromossomo A de planta. Por exemplo, o minicromossomo pode compreender seqüências de cromossomo nativo de um cromossomo A, por exemplo, no caso de um minicromossomo de milho, ele pode compreender seqüências nativas de cromossomo de milho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10. Em uma modalidade, um minicromossomo de planta da invenção é derivado de um cromossomo de milho 7.

Em ainda modalidades adicionais, um minicromossomo de planta da invenção compreende seqüências de cromossomo nativo de um cromossomo B de planta. Para certas aplicações, os cromossomos B truncados de telômero podem fornecer benefício à medida que eles compreendem genes não essenciais que não são esperados para interferir com o fenótipo de planta ou com a expressão de transgenes do cromossomo. OS métodos de truncagem de telômero descritos aqui resultam em apagamento de seqüências de cromossomos nativos do cromossomo B, particularmente aquelas regiões que são distais do centrômero. Por apagamento de regiões do cromossomo B que controlam não-disjunção através da truncagem de telômero, os minicromossomos baseados nos cromossomos B segregarão normalmente. Virtualmente qualquer tipo de cromossomos B de planta pode ser usado como descrito aqui para obter minicromossomos de planta. Por exemplo, um minicromossomo de planta pode compreender seqüências de

cromossomo B nativo de milho, centeio ou sorgo ou de qualquer espécie de planta com cromossomos B ou qualquer espécie compreendendo um cromossomo B que foi introduzido (Jones e Rees, 1982). Em algumas modalidades, a truncagem cromossômica pode ser executada em uma célula de planta compreendendo múltiplos cromossomos B, tal como uma célula compreendendo pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou mais cópias de cromossomos B.

Em certos aspectos da invenção, pode ser preferencial que um minicromossomo compreendendo cromossomos B ausentes em plantas como a presença de um cromossomo B intacto possa causar não-disjunção de minicromossomos derivados de cromossomo B. Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece um método para manipular a dosagem de um minicromossomo de planta compreendendo seqüências de cromossomo B através da introdução de um cromossomo B intacto ou uma parte de um cromossomo B. Por exemplo, a dosagem de um minicromossomo de planta pode ser modulada introduzindo-se a seqüência de cromossomo B que controla a não-disjunção de centrômero B.

Um minicromossomo de planta de acordo com a invenção pode compreender um marcador selecionável que confere uma vantagem de crescimento sob condições particulares para células de plantas carregando o marcador, desse modo permitindo a identificação de plantas, células de plantas ou partes de plantas compreendendo o minicromossomo. Um marcador selecionável pode funcionar em células bacterianas. Um minicromossomo pode também compreender marcadores selecionáveis "negativos" que conferem susceptibilidade a um agente antibiótico, herbicida ou outro agente, desse modo permitindo a seleção contra plantas, células de plantas ou células de outro organismo de interesse compreendendo o minicromossomo particular. Além disso, em alguns aspectos, um minicromossomo de planta pode compreender um gene de restauração de fertilidade masculina tal como um gene Rf3.

Um minicromossomo de planta pode adicionalmente compreender seqüências de recombinação específica em sítio. Por exemplo, os mini-

cromossomos da invenção podem compreender um sítio lox ou FRT. A recombinação específica em sítio fornece um método conveniente para mover genes dentro e fora de cromossomos artificiais tal como os minicromossomos de planta da invenção. A mutagênese aleatória pode também ser fornecida dessa maneira. Os métodos para usar recombinação específica em sítio para mediar transferência de gene in vivo são bem-conhecidos na técnica. A recombinação específica em sítio pode ser usada para seqüencialmente adicionar genes a um minicromossomo de modo a fornecer os genes para um caminho bioquímico inteiro ou um conjunto de características agronomicamente de elite. Em alguns aspectos da invenção, a seqüência de telômero inserida em um cromossomo de planta de partida compreende seqüências de recombinação específica em sítio. Nesse aspecto, os minicromossomos de planta compreendendo seqüências de recombinação específica em sítio podem ser rapidamente gerados.

Em certas modalidades adicionais, um minicromossomo de planta pode compreender genes que controlam o número de cópia do minicromossomo em uma célula. Um exemplo de tal gene é o elemento de cromossomos B que media não-disjunção como descrito acima. Um ou mais genes estruturais podem também ser compreendidos em um minicromossomo. Especificamente observados como sendo útil são tantos genes estruturais quanto podem ser inseridos em um minicromossomo enquanto ainda mantendo um cromossomo artificial transmitido funcional e fielmente. Isso pode incluir um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou mais genes estruturais.

Em outra modalidade, a invenção fornece métodos para expressar um ou mais genes estranhos em plantas, células de plantas ou células de qualquer outro organismo de interesse. O gene(s) estranho(s) pode ser de qualquer organismo, incluindo plantas, animais e bactérias. Em uma modalidade, o gene(s) estranho(s) conferem características agrônômicas aperfeiçoadas a uma dada planta. Por exemplo, o transgene pode conferir um traço tal como resistência a inseto, tolerância a herbicida, metabolismo de carboidrato alterado, metabolismo de ácido graxo alterado, resistência à do-

enças, e resistência a pesticida. Observa-se adicionalmente que os minicromossomos podem ser usados para simultaneamente transferir múltiplos genes estranhos a uma planta compreendendo caminhos regulatórios ou bioquímicos inteiros. Em ainda outra modalidade, observa-se que os minicromossomos de planta podem ser usados como vetores de clonagem de DNA. Tal vetor poderia ser usado em projetos de seqüenciamento de plantas e animais. Em alguns casos específicos, um transgene pode ser introduzido em um cromossomo de partida junto com seqüências de repetição de telômero desse modo gerando um minicromossomo de planta compreendendo o transgene.

Em uma modalidade adicional, é fornecida uma célula de planta compreendendo o minicromossomo de planta. A célula de planta pode ser a mesma espécie da espécie do cromossomo de planta de partida, entretanto, em certos casos, ela pode ser uma espécie diferente. Assim, uma planta ou uma semente de planta compreendendo um minicromossomo de planta também forma parte da invenção. Em certos aspectos, uma planta compreendendo o minicromossomo é uma planta de milho.

Em geral, os métodos e composições da invenção envolvem truncagem de cromossomo mediado por telômero. Por exemplo, um vetor compreendendo telômeros de plantas é introduzido em uma célula de planta. Tais vetores podem ser introduzidos em uma célula de planta por qualquer dos métodos que são bem-conhecidos na técnica, por exemplo, bombardeamento de DNA ou transformação mediada por *Agrobacterium*. Por exemplo, em certas modalidades, a transformação mediada por *Agrobacterium* pode ser usada para gerar minicromossomos de planta derivados de cromossomos A. De forma oposta, em alguns casos, o bombardeamento de DNA pode ser usado para gerar minicromossomos de planta derivados de cromossomos B. Mediante a integração de seqüências de telômero em uma ou mais posições de um cromossomo de planta, o cromossomo será truncado no ponto de integração. Assim, um método da invenção pode compreender transformar um cromossomo de planta de partida com um ácido nucléico heterólogo compreendendo pelo menos duas seqüências de repetição de

telômero e permitindo que a truncagem do cromossomo de planta de partida ocorra para produzir um minicromossomo de planta. Um ou ambos os braços de um cromossomo podem ser truncados por integração de telômero. Os minicromossomos de planta resultantes podem então ser truncados por
5 integração de telômero. Os minicromossomos de planta resultantes podem então ser varridos para determinar seu tamanho e origem, por exemplo, por Southern blot ou FISH.

Em alguns métodos adicionais da invenção, um cromossomo de planta de partida é transformado com seqüência de ácido nucléico heteróloga compreendendo repetições de telômero e seqüências adicionais tais como seqüências de recombinação específica em sítio, seqüência de transgene ou outra seqüência selecionada. Alternativamente, um cromossomo de planta de partida pode ser transformado com seqüência de ácido nucléico heteróloga compreendendo repetições de telômero para gerar um minicromossomo de planta. Subseqüentemente, o minicromossomo de planta pode ser transformado com uma segunda seqüência de ácido nucléico heteróloga compreendendo uma seqüência adicional tal como um transgene. Por exemplo, seqüências adicionais podem compreender sítio lox ou FRT. Em alguns casos, a seqüência adicional pode também compreender um gene
15 que confere resistência a inseto, tolerância a herbicida, metabolismo de carboidrato alterado, metabolismo de ácido graxo alterado, resistência à doenças, restauração de fertilidade masculina e resistência a pesticida. Assim, em certas modalidades, o gene adicional pode ser um gene de restauração de fertilidade masculina tal como um gene Rf3. Esse aspecto da invenção
20 pode ser particularmente vantajoso desde que os minicromossomos de planta que restauram fertilidade masculina possam ser transmitidos a células de progênie com eficiência muito alta.

As modalidades discutidas no contexto de métodos e/ou composição da invenção podem ser empregadas com relação a qualquer outro método ou composição descrita aqui. Assim, uma modalidade pertencente a um
30 método ou composição pode ser aplicada a outros métodos e composições da invenção também.

Como usado aqui na especificação, "um" ou "uma" pode significar um ou mais. Como usado aqui nas reivindicações, quando usado em conjunto com a palavra "compreendendo", as palavras "um" ou "uma" podem significar um ou mais do que um.

5 O uso do termo "ou" nas reivindicações é usado para significar "e/ou" a menos que explicitamente indicado para se referir a alternativas somente ou as alternativas são mutuamente exclusivas, embora a descrição suporte uma definição que se refira a somente alternativas e "e/ou". Como usado aqui, "outro" pode significar pelo menos um segundo ou mais.

10 Por todo este pedido de patente, o termo "aproximadamente" é usado para indicar que um valor inclui a variação inerente de erro para o dispositivo, o método sendo empregado para determinar o valor, ou a variação que existe entre os objetos de estudo.

Outros objetivos, características e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada. Dever-se-ia entender, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, enquanto indicando modalidades preferenciais da invenção, são dados a título de ilustração somente, desde que várias mudanças e modificações no espírito e escopo da invenção se tornarão aparentes àqueles versados na técnica a partir desta descrição detalhada.

20

Breve Descrição das Figuras

Os seguintes desenhos formam parte da presente especificação e são incluídos para adicionalmente demonstrar certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser mais bem entendida por referência a um ou mais desses desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas aqui.

25

A figura 1: exemplos de construções de truncagem cromossômica. As construções pWY76 e pWY86, e a construção de controle pWY96 são diagramadas. Os significados das designações de letra na figura são como segue: LB, borda esquerda de T-DNA; RB, borda direita de T-DNA; Tvsp, terminador a partir do gene de proteína de armazenamento vegetativo de soja; Bar, gene de resistência a bialafos como um gene marcador selecioná-

30

vel; TEV, região não traduzida de vírus mosaico do tabaco 5'; P35S, promotor 2X35S de vírus mosaico de couve-flor (CaMV); Tnos, terminador Nos do *Agrobacterium tumefaciens*; Tmas, terminador Mas de *A. tumefaciens*; Pnos, promotor Nos de *A. tumefaciens*; Pmas1', promotor Mas de *A. tumefaciens*;

5 sítios de recombinação específica em sítio lox e FRT; HPT, gene de resistência a higromicina B; GFP, gene de proteína fluorescente; DsRed, proteína fluorescente vermelha; FLP, gene de recombinase específica em sítio; Te-

10 lômeros, unidades de telômero de pAtT4 isolados a partir de *Arabidopsis thaliana* (Richards e Ausubel 1988). As setas indicam a direção de transcrição ou no caso das repetições de telômero, a orientação cromossômica.

A figura 2 ilustra a estrutura de pJV21. As quatro partes funcionais são indicadas por parênteses e rotuladas. LB, borda esquerda; RB, borda direita; lox, sítio lox66; Cre, gene de Cre recombinase; bar, gene de resistência a bialafos; 35S, promotor 35S de CaMV; ubi, promotor de ubiquitina

15 de milho; n3', seqüência terminadora do gene de sintase nopalina; telo, repetições de telômero 400 bp de Arabidopsis; NotI e Ascl, sítios de enzima de restrição.

Descrição Detalhada da Invenção

Um dos objetivos de cultivo de plantas é a seleção de características desejáveis tal como doença e resistência a inseto, taxa de crescimento, exigências e resultados de nutrientes. Infelizmente, em muitas variedades de espécies de plantas diferentes são ótimas para regiões geográficas e climáticas. Entretanto, cultivar uma característica desejável ou gene em cada variedade pode levar anos desde que qualquer dada característica deve ser

20 selecionada enquanto mantendo as vantagens específicas de uma dada variedade. Modificando alguns traços ou empilhamento de traços podem exigir múltiplos transgenes, que complica a introgressão. Assim, idealmente genes que conferem características agronomicamente superiores poderiam ser fornecidos em um cromossomo separado e assim seria não ligado a outros genes

25 e facilmente selecionados em plantas de progênie. Entretanto, até agora um minicromossomo de planta que é capaz de codificar genes não foi descrito.

30

A invenção supera as limitações na técnica fornecendo minicromossomos de planta que podem ser usados para incorporar transgenes desejáveis. Em certos casos, o minicromossomo pode ser passado por introgressão em qualquer variedade particular de planta desde que ele não seja
5 ligado a quaisquer genes de fundo, codificados em outros cromossomos. Esses minicromossomos podem adicionalmente compreender sítios de recombinação específica em sítio que habilitam os genes a serem rapidamente movidos dentro ou fora de qualquer variedade de planta compreendendo o minicromossomo. Assim, esses novos minicromossomos de planta reduzem
10 os problemas associados com arraste de ligação fornecendo uma plataforma de expressão geneticamente isolada.

1. Sistemas de Recombinação

Em certas modalidades da invenção, os minicromossomos de planta compreendem pelo menos um sítio de recombinase específica em
15 sítio. Os sistemas de recombinase integrase específica em sítio foram identificados em vários organismos incluindo, mas não limitados a, sistema Cre/lox de bacteriófago P1 (Abremski e outros, 1983; Patente U.S. Nº 4.959.317; Patente U.S. Nº 5.658.772), o sistema de levedura FLP/FRT (Golic e Lindquist, 1989), a Pin recombinase de *E. coli* (Enomoto e outros,
20 1983), a Gin/gix recombinase de fago Mu (Maeser e outros, 1991), o sistema R/RS do plasmídeo pSR1 de *Zygosaccharomyces rouxii* (Onouchi e outros, 1991; Araki e outros, 1992) e a R recombinase de *Zygosaccharomyces rouxii* (Onouchi e outros, 1995). Todos esses sistemas foram mostrados para funcionar em plantas (O’Gorman e outros, 1991; Maeser e outros, 1991; Onouchi e outros, 1991; Dale e Ow, 1991). Acredita-se que os sistemas de integração direcionados em sítio como Cre/lox ou FLP/FRT exigem um intermediário de DNA circular. Desses sistemas, Cre/lox e FLP/FRT foram amplamente utilizados.

O sistema FLP/FRT é nativo à levedura *Saccharomyces cerevisiae*
30 *siae* (Golic e Lindquist, 1989; revisado em Futcher, 1988). Em levedura, a enzima de recombinase (FLP) reside em um plasmídeo de 2 μ e reconhece repetições invertidas de 599 pares base (bp) inclui somente 34 bp; duas re-

petições invertidas de 13 bp separadas por uma região espaçadora de 8 bp assimétrica embora uma terceira repetição não-essencial da seqüência 13 bp esteja freqüentemente presente (Sauer, 1994). O rearranjo mediado por FLP de DNA flanqueado por repetições invertidas de seqüência FRT freqüentemente resulta na inversão do DNA entre os sítios alvo FRT. Nesse caso, ambos os sítios FRT são retidos. A FLP recombinase pode também reconhecer diretamente repetidos sítios alvo FRT. Os rearranjos mediados por FLP de DNA flanqueado por sítios FRT diretamente repetidos freqüentemente resultam na excisão do DNA localizado entre os sítios alvo FRT. Nesse caso, o DNA excisado é liberado na forma circular compreendendo um sítio FRT enquanto o segundo sítio FRT permanece na molécula de DNA modelo. A FLP recombinase pode também mediar recombinação entre os sítios FRT em diferentes moléculas de DNA; por exemplo, a FLP recombinase pode mediar a recombinação entre sítios FRT em diferentes cromossomos. Sadowski (1995) mostrou que a recombinação catalisada por FLP/FRT é reversível em natura.

A troca de DNA catalisada por FLP/FRT pode ser executada in vitro à medida que a FLP recombinase purificada foi mostrada para mediar a recombinação entre sítios FRT (Meyer-Leon e outros, 1984). A combinação de levedura FLP/FRT foi também usada para recombinação específica em sítio direta, ambas a excisão e a amplificação de seqüências flanqueadas por sítios FRT, em *Escherichia coli* (Cox, 1983) bem como em genomas de *Drosophila* (Golic e Lindquist, 1989; Golic, 1994). FLP/FRT também foi empregado para direcionar excisão específica em sítio de partes de transgenes de DNA de plasmídeo em protoplastos de milho e arroz por recombinação homóloga (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.527.695). FLP/FRT foi também utilizada em milho transformado estavelmente para direcionar excisão em sítio de seqüências inseridas no genoma de milho que são flanqueadas por sítios FRT (Patentes U.S. Nºs 5.929.301 e 6.175.058). O direcionamento cromossômico específico em sítio de DNA estranho em cromossomos bacterianos e mamíferos pode também ser efetuado por FLP/FRT (Huang e outros, 1991; O'Gorman e outros, 1991) e sua inserção por FLP em sítios FRT

foi mostrada como sendo reversível em genomas não-levedura (Huang e outros, 1997). É possível suficientemente alterar sítios FRT tal que a recombinação ocorra, mas não é reversível (Patente U.S. Nº 6.187.994) ou favorece uma reação adiante em relação a uma reação reversa (Senecoff e outros, 5 1988).

Um segundo sistema de recombinação bem caracterizado é aquele de Cre/lox de bacteriófago P1 (Abremski e outros, 1983; revisado em Craig, 1988; Sauer, 1994; Ow, 1996). A Cre recombinase (causando recombinação) reconhece seqüências alvo lox (local de recombinação (x)) e media 10 a recombinação específica em sítio entre os sítios lox compatíveis. Os sítios compatíveis podem ou não compreender seqüências idênticas. Os sítios lox são 34 pares base em comprimento, compreendendo duas repetições invertidas de 13 bp separadas por 8 bp ou outros nucleotídeos espaçadores. As seqüências lox incluem loxP de bacteriófago P1 (Albert e outros, 1995) bem 15 como sítios *loxB*, *loxL*, e *loxR* que são seqüências de nucleotídeos isoladas de *E. Coli* (Hoess e outros, 1982). As variantes funcionais de sítios loxP relacionados incluem, mas não são limitados a lox66, lox71, e lox72 (Albert e outros, 1995; Langer e outros, 2002). As seqüências lox podem também ser produzidas por uma variedade de técnicas sintéticas que são conhecidas na 20 técnica. Exemplos de técnicas sintéticas para produzir sítios lox funcionais são descritos por Ogilvie e outros (1982) e Ito e outros (1982).

O sítio lox é uma seqüência de nucleotídeo assimétrica e como tal, sítios lox na mesma molécula de DNA podem ter a mesma orientação ou orientação oposta com relação um ao outro. A recombinação entre sítios lox 25 na mesma orientação resulta em um apagamento do segmento de DNA localizado entre os dois sítios lox. Nesse caso, a ligação entre os térmicos resultantes da molécula de DNA original ocorre e um sítio lox é retido. O segmento de DNA apagado forma uma molécula circular de DNA que também contém um único sítio lox. A recombinação entre sítios lox em orientações 30 oposta na mesma molécula de DNA resulta em uma inversão da seqüência de nucleotídeo do segmento de DNA localizado entre os dois sítios lox. Em adição, a troca recíproca de segmentos de DNA próximos a sítios lox locali-

zados em duas diferentes moléculas de DNA pode ocorrer. Todos esses eventos de recombinação são catalisados pelo produto da região de codificação Cre e são reversíveis. É possível, entretanto, alterar suficientemente sítios lox tal que os eventos de recombinação ocorrem, mas são resistentes à reação de recombinação reversa (Albert *e outros*, 1995; Araki *e outros*, 1997; Publicação PCT WO 01/11058) ou tal que dois sítios são substratos de recombinação "não compatíveis" para a recombinase (Hoess *e outros*, 1986; Trinh e Morrison, 2000; Lee e Saito, 1988; EP 1 035 208). É também possível impedir que a reação reversa ocorra removendo a fonte de recombinase, por exemplo, cultivando ou usando promotores regulatórios particulares.

A Cre recombinase também efetua integração direcionada em sítio. Por exemplo, um gene repórter lacZ foi integrado com o genoma de células de ovários de Hamster Chinês (CHO) usando Cre-recombinase, um único sítio lox no vetor de direcionamento lacZ e um único sítio lox previamente localizado no DNA genômico de CHO (Fukushige e Sauer, 1992). A Cre recombinase foi mostrada para mediar a recombinação entre sítios lox em levedura (Sauer, 1987) e plantas, tal como tabaco e *Arabidopsis* (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.658.772; Medberry, *e outros*, 1995; Albert *e outros*, 1995) bem como em células de mamíferos tal como ratos (Sauer e Henderson, 1988; Fukushige e Sauer, 1992; Sauer, 1998). A integração específica em sítio de grandes fragmentos BAC (minicromossomo bacteriano) em genomas de plantas e fungos utilizando um sistema de recombinação Cre/lox foi reportada (Choi *e outros*, 2000). Acredita-se que de modo a alcançar integração direcionada em sítio em um único sítio lox genômico, uma molécula de DNA circular compreendendo um único sítio lox deve ser introduzida na célula. Portanto, os métodos da presente invenção tornam possível alcançar integração direcionada em sítio de moléculas de DNA carecendo de seqüências auxiliares que são freqüentemente presentes de modo a replicar e manter as moléculas circular em uma célula hospedeira bacteriana. Wallace *e outros* (2000) e Day *e outros* (2000) discutem o uso de integração direcionada em sítio como um método para pré-selecionar sítios no

genoma para expressão repetitiva de transgenes em células-tronco embrionárias ou tabaco, respectivamente.

A Cre recombinase pode contatar e efetuar recombinação utilizando um número de sítios lox incluindo, mas não limitados a loxP e um número de variantes do loxP tipo selvagem tal como lox66 (Albert e outros, 1995). A troca de DNA direcionada pelos sítios lox ocorre na região espaçadora de 8 bp e essencialmente afeta uma troca das repetições invertidas de 13 bp dos dois sítios lox envolvidos. Por exemplo, a recombinação direcionada em sítio na qual um único sítio lox em uma molécula de DNA recombina com um segundo único sítio lox em uma segunda molécula de DNA gera uma seqüência na qual o DNA integrado é flanqueado por um sítio lox em qualquer lado. Quando os únicos sítios lox nas moléculas separadas envolvidas são idênticos, os dois sítios lox resultantes adjacentes ao DNA inserido são também idênticos. Se, entretanto, os dois únicos sítios lox nas moléculas de partida não são idênticos nas repetições invertidas de 13 bp, os dois sítios lox resultantes adjacentes ao DNA inserido diferirão dos sítios lox de partida. Por exemplo, se um primeiro único sítio lox66 é envolvido em integração direcionada em sítio com um segundo único sítio lox71, os sítios lox resultantes flanqueando o DNA inserido compreendem seqüências de sítios loxP e lox72 (Albert e outros, 1995).

A integração direcionada em sítio utilizando sítios lox ou FRT idênticos nas duas moléculas recombinantes resulta no DNA inserido sendo flanqueado por sítios de recombinação idênticos, uma reação que é facilmente revertida pela recombinase. Para impedir o apagamento da seqüência inserida, é freqüentemente desejável remover a fonte de enzima recombinase, por exemplo, por segregação ou localizando o gene de recombinase sob o controle de um promotor induzido e removendo a fonte de indução. Alternativamente, um versado na técnica pode usar seqüências de recombinação específicas em sítio projetadas tal que depois de reação de integração, os sítios resultantes não são compatíveis para uma reação reversa ou recombina em uma taxa reduzida.

Um versado na técnica reconhecerá que a enzima integrase, tal

como Cre ou FLP recombinase, pode ser fornecida ao sítio ou sítios alvo, tal como lox ou FRT, por qualquer meio conhecido na técnica. Por exemplo, a recombinase pode ser fornecida de forma transiente por expressão de um gene, e seqüências de controle apropriadas, que residem em um plasmídeo

5 separadamente mantido nas células hospedeiras. O gene de recombinase e seqüências de controle apropriadas podem ser inseridos no genoma do organismo e estavelmente expressos nas células hospedeiras. Alternativamente, o cruzamento sexual ou o cultivo pode ser usado para introduzir a recombinase a células contendo o sítio ou sítios lox ou FRT alvo; nesse caso, um

10 organismo tal como planta contendo o gene de recombinase poderia ser cruzado para uma planta contendo os sítios lox ou FRT alvo e a progênie dessa união conteria ambos a recombinase e o sítio ou sítios alvo. Em alguns casos, a codificação mRNA para a recombinase desejada pode ser introduzida nas células hospedeiras para codificar e fornecer a proteína re-

15 combinase. Em outros casos, um pode introduzir proteína recombinase isolada em uma célula hospedeira compreendendo um sítio de recombinação alvo. EM qualquer desses casos, o promotor direcionando expressão de recombinase pode ser, mas não limitado a maneira constitutiva ou induzida. Um versado na técnica também reconhecerá que os genes para genes de

20 recombinase tal como Cre ou FLP podem ser isolados de bacteriófago P1 ou *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, e utilizados diretamente em um novo sistema hospedeiro ou a seqüência de gene pode ser otimizada para uso de códon para expressão no hospedeiro transgênico. De um modo similar, um versado na técnica reconhecerá que nativamente ocorrendo bem

25 como sítios alvo sintéticos podem ser reconhecidos e mediam recombinação com uma recombinase apropriada.

Exemplos de substituição de gene mediada por recombinase ou excisão de gene tipicamente utilizam dois sítios alvo flanqueando a seqüência a ser substituída ou excisada. Por exemplo, Odell e outros (Patente U.S.

30 Nº 5.658.772) descrevem o uso de dois sítios loxP e Cre-recombinase para gerar substituições de gene específicas em tabaco. O sistema Cre/lox foi também usado de uma maneira induzida para ativar e remover transgenes

em plantas transgênicas (Publicação PCT WO 01/40492). Baszczyński e outros (Patente U.S. Nº 6.187.994) descreve o uso de múltiplos sítios FRT não idênticos e FLP-recombinase para gerar uma variedade de alterações de gene em milho. Baszczyński e outros (Patente U.S. Nº 6.262.341) também descrevem o uso de uma Cre/FLP recombinase quimérica com dupla especificidade de sítio alvo para efetuar recombinação de seqüências de DNA flanqueadas por uma seqüência lox em uma lateral e uma seqüência FRT em outra lateral. Em cada um desses casos, a integração ou excisão de seqüências gera fragmentos de DNA estranhos como parte do esquema de recombinação. A integração direcionada em sítio, entretanto, pode utilizar somente um sítio alvo no genoma recipiente. A presente invenção propõe integração direcionada mediada por Cre de uma molécula circular pronta para transformação gerada in vitro não replicada contendo um primeiro único sítio lox em um segundo único sítio lox previamente introduzido no genoma alvo.

II. Genes para uso na invenção

Um versado na técnica entenderá que os minicromossomos da invenção podem ser usados para expressar uma variedade de genes. Em algumas modalidades preferenciais, tais genes conferem características agronomicamente de elite a uma planta compreendendo um minicromossomo da invenção. Alguns exemplos não limitantes de genes para uso na invenção são fornecidos abaixo.

A. Resistência a Herbicida

Inúmeros genes de resistência a herbicida são conhecidos e podem ser empregados com a invenção. Um exemplo é um gene conferindo resistência a um herbicida que inibe o ponto de crescimento ou meristema, tal como uma imidazalinona ou uma sulfoniluréia. Genes exemplificados nesse código de categoria para enzima ALS e AHAS mutante como descritos, por exemplo, por Lee e outros (1988); Gleen e outros, (1992); e Miki e outros, (1990).

Os genes de resistência para glifosato (resistência conferida por 5-enolpiruvil-3 fosfochiquimato sintase (EPSP) e genes *aroA*, respectivamen-

te) e outros compostos fosfona tal como glufosinato (genes fosfinotricina acetil transferase (PAT) e *Streptomyces hygroscopicus* fosfinotricin-acetil transferase (*bar*)) podem também ser usados. Ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.940.835 para Shah, e outros, que descreve a seqüência de nucleotídeo de uma forma de EPSPS que pode conferir resistência a glifosato. A molécula de DNA codificando um gene *aroA* mutante pode ser obtida sob número de acesso ATCC 39256, e a seqüência de nucleotídeo do gene mutante é descrita na Patente U.S. Nº 4.769.061 para Comai. O pedido de patente europeu Nº 0 333 033 para Kumada e outros, e a Patente U.S. Nº 4.975.374 para Goodman e outros, descrevem seqüências de nucleotídeo de genes glutamina sintetase que conferem resistência a herbicidas tal como L-fosfinotricina. A seqüência de nucleotídeo de um gene fosfinotricina-acetiltransferase é fornecida no pedido europeu Nº 0 242 246 para Leemans e outros, DeGreef e outros (1989), descrevem a produção de plantas transgênicas que expressam genes *bar* quiméricos codificando a atividade de fosfinotricina acetil transferase. Exemplos de genes conferindo resistência a ácidos fenóxi propiônicos e ciclohexanodionas, tal como setoxidima e haloxifop, são os genes *Acct-S1*, *Acc1-S2* e *Acct-S3* descritos por Marshall e outros (1992).

Os genes são também conhecidos conferindo resistência a um herbicida que inibe a fotossíntese, tal como uma triazina (genes *psbA* e *gs+*) e uma benzonitrila (gene nitrilase). Przibilla e outros (1991), descrevem a transformação de *Chlamydomonas* com plasmídeos codificando genes *psbA* mutantes. As seqüências de nucleotídeos para genes nitrilase são descritas na Patente U.S. Nº 4.810.648 para Stalker, e moléculas de DNA contendo esses genes estão disponíveis sob Nos. de acesso ATCC 53435, 67441, e 67442. A clonagem e a expressão de codificação de DNA para uma glutathiona S-transferase é descrita por Hayes e outros (1992).

B. Esterilidade Masculina e Restauração de Fertilidade masculina

Exemplos de genes conferindo esterilidade masculina bem como restauradores de fertilidade masculina são conhecidos na técnica e incluem aqueles descritos na Patente U.S. Nº 3.861.709, Patente U.S. Nº 3.710.511,

Patente U.S. Nº 4.654.465, Patente U.S. Nº 4.727.219, Patente U.S. Nº 5.530.191, Patente U.S. Nº 5.625.132, e Patente U.S. Nº 5.689.041, cada uma das descrições são especificamente incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

5 Os genes de esterilidade masculina podem aumentar a eficiência com a qual híbridos são feitos, já que eles eliminam a necessidade de fisicamente castrar a planta de milho usada como uma fêmea em um dado cruzamento.

Onde um deseja empregar sistemas de esterilidade masculina com uma planta de milho de acordo com a invenção, pode ser benéfico também utilizar um ou mais genes restauradores de fertilidade masculina. Por exemplo, quando a esterilidade masculina citoplásmica (CMS) é usada, a produção de semente híbrida exige três linhagens de cruzamento: (1) uma linhagem de macho citoplasmicamente estéril tendo um citoplasma CMS; (2) 15 um cruzamento fértil com citoplasma normal, que é isogênico com a linhagem CMS para genes nucleares ("linhagem "mantenedora"); e (3) um cruzamento fértil distinto com citoplasma normal, carregando um gene de restauração de fertilidade (linha "restauradora"). A linhagem CMS é propagada por polinização com a linhagem mantenedora, com todos da progênie sendo 20 machos estéreis, à medida que o citoplasma CMS é derivado do parente fêmea. Essas plantas estéreis macho podem então ser eficientemente empregadas como o parente fêmea em cruzamentos híbridos com a linhagem restauradora, sem a necessidade por castração física das partes reprodutivas macho do parente macho.

25 A presença de um gene restaurador de fertilidade masculina resulta na produção de progênie híbrida F1 completamente fértil. Se nenhum gene restaurador está presente no parente macho, os híbridos estéreis machos são obtidos. Tais híbridos são úteis onde o tecido vegetativo da planta de milho é utilizado, por exemplo, para silagem, mas na maioria dos casos, 30 as sementes serão consideradas a parte mais valiosa da colheita, então a fertilidade dos híbridos nessas colheitas deve ser restaurada. Portanto, um aspecto da invenção atual considera a planta de milho híbrida CH389090

compreendendo um local genético capaz de restaurar a fertilidade masculina em uma planta macho de outra forma estéril. Exemplos de genes de esterilidade masculina e restauradores correspondentes que poderiam ser empregados com as plantas da invenção são bem-conhecidos àqueles versados na técnica de cultivo de plantas e são descritos, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.530.191; Patente U.S. Nº 5.689,041; Patente U.S. Nº 5.741.684; e Patente U.S. Nº 5.684.242, as descrições das quais são especificamente incorporadas aqui por referência em sua totalidade. Por exemplo, o gene restaurador pode ser um gene Rf3 (Duvick, 1965; Chase e Gabay-Laughnan 2004; Gabay-Laughnan *e outros*, 2004) ou genes usados no sistema de restauração Barnase/Barstar (Mariani *e outros*, 1990; Mariani *e outros*, 1992).

C. Resistência a Doenças

As defesas da planta são freqüentemente ativadas por interação específica entre o produto de um gene de resistência à doenças (R) na planta e o produto de um gene de avirulência (Avr) no patógeno. Uma linhagem de planta pode ser transformada com gene de resistência clonado para plantas criadas por engenharia que são resistentes a cepa patogena específica. Ver, por exemplo, Jones *e outros*, (1994) (clonagem do gene Cf-9 do tomate para resistência a *Cladosporium fulvum*); Martin *e outros*, (1993) (gene Pto do tomate para resistência a *Pseudomonas syringae pv.*); e Mindrinos *e outros*, (1994) (gene RSP2 de *Arabidopsis* para resistência a *Pseudomonas syringae*).

Uma proteína invasiva viral ou uma toxina complexa derivada desta pode também ser usada para resistência a doenças virais. Por exemplo, o acúmulo de proteínas de revestimento viral em células de planta transformadas confere resistência à infecção viral e/ou desenvolvimento de doença efetuado pelo vírus a partir do qual o gene de proteína de revestimento é derivado, bem como por vírus relacionados. Ver Beachy e outros (1990). A resistência mediada por proteína de revestimento foi conferida mediante plantas transformadas contra vírus do mosaico de alfafa, vírus do mosaico de pepino, vírus risca do tabaco, vírus X da batata, vírus Y da batata, vírus etch do tabaco, vírus rattle do tabaco e vírus mosaico do tabaco.

Um anticorpo específico de vírus pode também ser usado. Ver, por exemplo, Tavladoraki e outros, (1993), que mostrou que as plantas transgênicas expressando genes de anticorpo recombinante são protegidos de ataque de vírus.

- 5 Logemann e outros, (1992), por exemplo, descrevem plantas transgênicas expressando um gene de inativação de ribossoma barley têm uma resistência a doenças fúngicas.

D. Amido Ceroso

- A característica cerosa é um exemplo de um traço recessivo. Nesse exemplo, a progênie resultante da primeira geração de retrocruzamento (BC1) deve estar crescendo e não híbridos. Um teste é então executado na semente não híbrida a partir da planta BC1 para determinar quais plantas BC1 carregaram o gene recessivo para o traço ceroso. Em outros traços recessivos, o teste de progênie adicional, por exemplo, gerações adicionais crescentes tal como BC1S1, pode ser exigido para determinar quais plantas carregam o gene recessivo.
- 10
15

E. Resistência a Inseto

- Um exemplo de um gene de resistência a inseto inclui uma proteína *Bacillus thuringiensis*, um derivado dessa ou um polipeptídeo sintético modelado neste. Ver, por exemplo, Geiser e outros (1986), que descrevem a clonagem e a seqüência de nucleotídeo de um gene de δ -endotoxina Bt. Além disso, os genes δ -endotoxina de codificação das moléculas de DNA podem ser adquiridos a partir da American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, por exemplo, sob Nos. De acesso ATCC 40098, 67136, 31995 e 31998. Outro exemplo é uma lectina. Ver, por exemplo, Van Damme e outros, (1994), que descrevem as seqüências de nucleotídeo de vários genes de lectina de ligação de manose *Clivia miniata*. Uma proteína de ligação de vitamina pode também ser usada, tal como avidina. Ver Pedido PCT US93/06487, os conteúdos dos quais são incorporados por referência. Este pedido ensina o uso de avidina e homólogos de avidina como larvicidas contra pestes de insetos.
- 20
25
30

Ainda outro gene de resistência a inseto é um inibidor de enzi-

ma, por exemplo, um inibidor de protease ou proteinase ou um inibidor de amilase. Ver, por exemplo, Abe e outros, (1987) (seqüência de nucleotídeo de inibidor de proteinase de cisteína de arroz), Huub e outros (1993) (seqüência de nucleotídeo de inibidor I de proteinase de tabaco codificando cDNA), e Sumitani e outros (1993) (seqüência de nucleotídeo de inibidor de α -amilase *Streptomyces nitrosporeus*). Um hormônio específico de inseto ou feromônio pode também ser usado. Ver, por exemplo, a descrição por Hammock e outros (1990), de expressão de baculovírus de esterase de hormônio juvenil clonado, um ativador de hormônio juvenil.

10 Ainda outros exemplos incluem um anticorpo específico de inseto ou uma imunotoxina derivada deste e uma proteína atrativa de desenvolvimento. Ver Taylor e outros (1994), que descreveu inativação enzimática em tabaco transgênico via a produção de fragmentos de anticorpo de cadeia única.

15 F. Metabolismo de Ácido Graxo modificado, Carboidrato e Fitato

Os genes podem ser usados conferindo metabolismo de ácido graxo modificado. Por exemplo, os genes estearil-ACP dessaturase podem ser usados. Ver Knutzon e outros (1992). Várias dessaturases de ácido graxo foram também descritas, tal como um gene OLE1 de *Saccharomyces cerevisiae* codificando dessaturase de ácido graxo $\Delta 9$, uma enzima que forma os ácidos graxos oléico (18:1) e palmitoleico (16:1) monoinsaturados de palmitoil (16:0) ou estearoil (18:0) CoA (McDonough e outros, 1992); um gene codificando uma proteína carreadora estearoil-acila delta-9 dessaturase de rícino (Fox e outros, 1993); dessaturases $\Delta 6$ e $\Delta 12$ de cianobactéria *Synechocystis* responsável pela conversão de ácido linoleico (18:2) em ácido gama-linoleico (gama 18:3) (Reddy e outros, 1993); um gene de *Arabidopsis thaliana* que codifica uma dessaturase Omega-3 (Arondel e outros, 1992)); dessaturases $\Delta 9$ de planta (Publicação de Pedido PCT N° WO 91/13972) e dessaturases $\Delta 15$ de soja e Brassica (Publicação de Pedido de Patente Européia N° EP 0616644).

30 O metabolismo de fitato pode também ser modificado pela introdução de um gene de codificação de fitase para melhorar a ruptura de fitato,

adicionar mais fosfato livre à planta transformada. Por exemplo, ver Van Hartingsveldt e outros (1993), para uma descrição da seqüência de nucleotídeo de um gene de fitase *Aspergillus niger*. Em milho, isso, por exemplo, poderia ser executado clonando e então reintroduzindo DNA associado com o único
5 alelo que é responsável para mutantes de milho caracterizados por baixos níveis de ácido fítico. Ver Raboy e outros (1990).

Um número de genes é conhecido, o que pode ser usado para alterar metabolismo de carboidrato. Por exemplo, as plantas podem ser transformadas com uma codificação de gene para uma enzima que altera o
10 padrão de ramificação de amido. Ver Shiroza e outros (1988) (seqüência de nucleotídeo de gene fructosiltransferase de *Streptococcus mutans*), Steinmetz e outros, (1985) (seqüência de nucleotídeo de gene levansucrase *Bacillus subtilis*), Pen e outros, (1992) (produção de plantas transgênicas que expressam α -amilase de *Bacillus licheniformis*), Elliot e outros, (1993) (mutagênese direcionada em sítio de gene de α -amilase de barley), e Fisher e
15 outros (1993) (enzima II de ramificação de amido de endosperma de milho). O gene Z10 codificando uma proteína de armazenamento de zeína 10kD de milho pode também ser usado para alterar as quantidades de zeína 10kD nas células em relação a outros componentes (Kiri-hara e outros, 1988).

20 III. Plantas e Seus Usos

A presente invenção fornece uma planta transgênica compreendendo um minicromossomo de planta da invenção incluindo, sem limitação, alfafa, milho, canola, arroz, soja, tabaco, grama, aveia, centeio, e trigo, entre outros. Também incluída está uma semente de uma planta, a semente com-
25 preende um minicromossomo da invenção.

Por exemplo, em certas modalidades, uma semente compreendendo um minicromossomo da invenção pode expressar um gene que fornece tolerância a herbicida. Um exemplo benéfico de um gene de tolerância a herbicida fornece resistência a glifosato, N-(fosfometil)glicina, incluindo a
30 forma de sal isopropilamina de tal herbicida.

A presente invenção pode ser, na prática, combinada com outros traços de controle de doença em uma planta para alcançar traços desejados

para melhorar o controle de doenças em plantas. Combinar os traços de controle de doenças que empregam modos de ação distintos pode fornecer plantas transgênicas protegidas com consistência e durabilidade superiores sobre plantas acolhendo um único traço de controle da probabilidade reduzi-
5 da que resistência desenvolverá no campo.

A invenção também se refere a produtos de consumo contendo um ou mais dos minicromossomos da presente invenção, e produzidos a partir de uma planta recombinante ou semente contendo um ou mais minicromossomos. Um produto de consumo contendo uma ou mais das seqüên-
10 cias da presente invenção pretende incluir, mas não limitado a, farinhas, óleos, grãos inteiros ou triturados de uma planta recombinante ou semente contendo uma ou mais das seqüências da presente invenção. A detecção de uma ou mais das seqüências da presente invenção em um ou mais produtos de consumo observados aqui é evidência de que o produto de consumo
15 compreende um minicromossomo da invenção.

Um aspecto adicional da invenção refere-se a culturas de tecido de plantas compreendendo minicromossomos. Como usado aqui, o termo "cultura de tecido" indica uma composição compreendendo células isoladas do mesmo tipo ou tipo diferente ou uma coleção de tais células organizadas
20 em partes de uma planta. Tipos exemplificados de culturas de tecidos são protoplastos, células de planta e calus que estão intactas em plantas ou partes de plantas, tal como embriões, pólen, flores, núcleos, espigas, castanhas, folhas, cascas, caules, raízes, pontas de raízes, anteras, seda, e seus similares. Em uma modalidade preferencial, a cultura de tecido compreende
25 embriões, protoplastos, células meristemáticas, pólen, folhas ou anteras derivadas de tecidos imaturos dessas partes de plantas. Meios para preparar e manter culturas de tecido de plantas são bem-conhecidos na técnica (Patente U.S. Nº 5.538.880; e Patente U.S. Nº 5.550.318, cada uma incorporada aqui por referência em sua totalidade). A título de exemplo, uma cultura de
30 tecido compreendendo órgãos tais como pendões ou anteras foi usada para produzir plantas regeneradas (Patente U.S. Nº 5.445.961 e Patente U.S. Nº 5.322.789; as descrições das quais são incorporadas aqui por referência).

Um tipo de cultura de tecido em milho é cultura de pendão/antera. Os pendões contêm anteras que, por sua vez, envolvem micrósporos. Os micrósporos desenvolvem em pólen. Para cultura de antera/micrósporo, se os pendões são a composição da planta, eles são preferencialmente selecionados em um estágio quando os micrósporos são uninucleados, ou seja, incluem somente um núcleo, ao invés de 2 ou 3. Os métodos para determinar o estágio correto são bem-conhecidos àqueles versados na técnica e incluem coloração fluorescente de mitramicina, azul de tripano (preferencial) e esmagamento em acetocarmina. O estágio de micrósporo mid-uninucleado foi encontrado como sendo o estágio de desenvolvimento mais responsivo aos métodos subseqüentes descritos para por fim produzir plantas.

Embora os órgãos de plantas contendo micrósporo tal como pendões podem geralmente ser pré-tratados em qualquer temperatura fria abaixo de aproximadamente 25°C, uma faixa de 4 a 25°C é preferencial, e uma faixa de 8 a 14°C é particularmente preferencial. Embora outras temperaturas resultem em embrióides e plantas regeneradas, as temperaturas frias produzem taxas de resposta otimizada comparada ao pré-tratamento em temperaturas fora da faixa preferencial. A taxa de resposta é media como ou o número de embrióides ou o número de plantas regeneradas por número de micrósporos iniciados na cultura. Os métodos exemplificados de cultura de micrósporo são descritos, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.322.789 e Patente U.S. Nº 5.445.961, as descrições das quais são especificamente incorporadas aqui por referência.

Ademais, em certas modalidades da invenção, uma planta de partida ou célula de planta é transformada com um ácido nucléico tal como um veto de truncagem de telômero. Os métodos para transformar células de plantas com ácidos nucléicos são bem-conhecidas àqueles versados na técnica. Por exemplo, os métodos podem empregar transformação mediada por *Agrobacterium* ou bombardeamento com partículas de DNA como exemplificado aqui. Certos métodos exemplificados para transformar ácidos nucléicos com alto peso molecular também foram desenvolvidos. Por exemplo, o sis-

tema BIBAC projetado por Hamilton e amigos (Hamilton, 1997; Hamilton e outros, 1996; Patente Nº 5,733,744) para a transformação de grandes inserções de DNA-T em genomas de plantas. O BIBAC é uma combinação da função de transferência de DNA-T do plasmídeo Ti e a capacidade de manter os grandes fragmentos de DNA do cromossomo artificial bacteriano (BAC). Como com um BAC, ele tem uma única origem de cópia de replicação do plasmídeo F de *E. coli* para manutenção estável do plasmídeo em *E. coli*. Ele também tem uma única origem de cópia de replicação a partir do plasmídeo Ri de *Agrobacterium*, e as bordas de DNA-T para transformação de DNA-T. UM sistema similar, cromossomos artificiais competentes de transformação (TAC), com uma origem P1 de bacteriófago *E. coli*, foram também usados na transformação de grandes DNAs (Liu e outros, 1999).

IV. Cultivo de Plantas Compreendendo um Minicromossomo

Como discutido acima, um cromossomo de planta nativo de partida pode ser usado de acordo com a invenção para gerar um minicromossomo de planta. Em algumas modalidades, os cromossomos nativos para uso na invenção atual serão cromossomos de milho tal como cromossomos B de milho ou um cromossomo A de milho. Por exemplo, quaisquer dos cromossomos de *Z. mays* listados na Tabela 1 podem ser usados como um cromossomo de partida para obter um minicromossomo da invenção.

A Tabela 1 ilustra os tamanhos para os cromossomos A de *Zea mays* em pares de Megabase (Mb) ou em centimorgans (cM). O tamanho em cM foi determinado via duas estratégias como descrito em Sharopova e outros, 2002.

Tabela 1: tamanhos de cromossomo A de *Zea mays*

Cromossomo	Tamanho		
	Pares de mega base (Mb)	IBM v2 (cM)	UMC98 (cM)
1	337	975	248
2	278	612	207
3	259	685	166
4	271	684	175
5	250	607	174
6	208	492	168
7	199	566	147
8	202	567	183
9	191	581	150
10	170	472	134

Entende-se também que em alguns casos, no minicromossomo compreende um sítio de recombinação específica em sítio. Assim, qualquer variedade de planta compreendendo o minicromossomo pode ser transformada com um vetor que habilita a introdução de transgene no minicromossomo por recombinação específica em sítio. Uma vez que um minicromossomo de planta é gerado, ele pode ser facilmente passado por introgressão em um fundo genético desejado por técnicas de cultivo de planta que são bem-conhecidos na técnica.

Assim, a presente invenção fornece processos para cultivar plantas que compreendem um minicromossomo. De acordo com tal processo, uma primeira planta parente pode ser cruzada com uma segunda planta parente onde estas compreendem um minicromossomo, ou onde pelo menos uma das plantas compreende um minicromossomo. Por exemplo, as plantas de milho (*Zea mays L.*) compreendendo um minicromossomo podem ser cruzadas ou por técnicas naturais ou mecânicas.

A polinização natural ocorre em plantas com flor quando o vento ou insetos espalham pólen de uma planta. Entretanto, a polinização mecânica pode ser efetuada controlando-se os tipos de pólen que são introduzidos ou por polinização manual. Em uma modalidade, o cruzamento compreende as etapas de:

- (a) plantar em proximidade de polinização, sementes de uma primeira e uma segunda planta parente, e preferencialmen-

- te, sementes de uma primeira planta endogâmica e uma segunda planta endogâmica distinta;
- (b) cultivar ou fazer crescer sementes da primeira e da segunda planta parente em plantas que produzem flores;
- 5 (c) emasculas flores ou da primeira ou da segunda planta parente, isto é, tratar as flores tal como para impedir a produção de pólen, ou alternativamente, usar como a planta parente fêmea uma planta estéril macho, desse modo fornecendo uma planta parente emasculada;
- 10 (d) permitir que a polinização cruzada natural ocorra entre a primeira e a segunda plantas parentes;
- (e) colher sementes produzidas na planta parente emasculada; e, onde desejado,
- (f) cultivar a semente colhida em uma planta, preferencialmente, uma planta híbrida.
- 15

As plantas parentais são tipicamente plantas em proximidade de polinização uma com a outra plantando-se as plantas parentais em linhas alternadas, em nós ou em qualquer outro padrão de plantação conveniente. Quando as plantas parentais diferem em tempo de maturidade sexual, pode-se desejar plantar a primeira planta que matura mais lentamente, desse modo assegurando a disponibilidade de pólen a partir da planta parente macho durante o tempo no qual a planta parente fêmea é receptiva ao pólen. As plantas de ambos os parentes parentais são cultivados e permitidos a crescer até o tempo de florescimento. Vantajosamente, durante esse estágio de crescimento, as plantas são, em geral, tratadas com fertilizante e/ou outras químicas agrícolas se considerado apropriado pelo agricultor.

20

25

Na hora do florescimento, no evento em que uma planta compreendendo um minicromossomo é a planta parente macho, o os órgãos que produzem pólen da outra planta parental são removidos de todas as plantas empregadas como a planta parental fêmea para evitar autopolinização. Isso pode ser alcançado manualmente, mas também pode ser feito por máquina, se desejado. Alternativamente, quando a planta parente fêmea compreende

30

um gene citoplásmico ou nuclear conferindo esterilidade masculina, a remoção dos órgãos que produzem pólen pode não ser exigida. Adicionalmente, um gametocida química pode ser utilizado para esterilizar as flores macho da planta fêmea. Nesse caso, as plantas parentais usadas como o macho 5 podem ou não ser tratadas com o agente químico ou podem compreender um fator genético que causa resistência aos efeitos emasculantes do agente químico. Os gametocidas afetam os processos ou células envolvidas no desenvolvimento, maturação ou liberação de pólen. As plantas tratadas com tais gametocidas são feitas machos estéreis, mas tipicamente permanecem 10 fêmeas férteis. O uso de gametocidas químicos é descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 4.936.904, a descrição da qual é especificamente incorporada aqui por referência em sua totalidade. Ademais, o uso de herbicida ROUNDUP (Monsanto, St. Louis, MO) em combinação com plantas de milho tolerantes a aglifosato para produzir plantas de milho estéreis macho é des- 15 crito na Publicação PCT WO 98/44140.

Seguindo emasculação, as plantas são então tipicamente permitidas a continuarem crescendo e a polinização cruzada natural ocorre como um resultado da ação do vento, que é normal na polinização de gramíneas, tal como milho. Como um resultado da emasculação da planta parental fêmea, todo o pólen da planta parental macho está disponível para polinização 20 porque as plantas que florescem produzindo pólen, foi previamente removido de todas as plantas da planta sendo usada como a fêmea na hibridização. É claro, durante esse processo de hibridização, as variedades parentais são cultivadas tal que elas são isoladas de outros campos de plantas para minimizar ou impedir qualquer contaminação acidental de pólen a partir de fontes 25 estranhas. Essas técnicas de isolamento são bem-conhecidas pelos versados na técnica.

Ambas as plantas parentais de um cruzamento podem ser permitidas a continuar crescendo até a maturidade ou as linhas macho podem 30 ser destruídas depois que o florescimento está completo. Somente as sementes das plantas parentais fêmeas são colhidas para obter as sementes de um novo híbrido F1. A nova semente híbrida F1 produzida pode então ser

plantada em uma estação de cultivo em campos comerciais ou, alternativa-
mente, avançada em protocolos de semeadura para propósitos de desenvol-
vimento de novas linhagens endogâmicas.

Alternativamente, em outra modalidade da invenção, uma ou
5 ambas a primeira e a segunda plantas parentes podem compreender um
minicromossomo de planta. Assim, qualquer planta compreendendo um mi-
nicromossomo da invenção forma uma parte da invenção. Como usado aqui,
o cruzamento pode significar autopolinização, retrocruzamento, cruzamento
com outra variedade ou a mesma variedade, cruzamento de populações, e
10 seus similares. Todas as plantas de milho produzidas usando planta com-
preendendo um minicromossomo como um parente estão, portanto, dentro
do escopo desta invenção.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são incluídos para adicionalmente ilus-
15 trar vários aspectos da invenção. Os versados na técnica deveriam apreciar
que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representam técnicas
e/ou composições descobertas pelo inventor para funcionarem bem na práti-
ca da invenção, e assim podem ser consideradas como constituindo modos
preferenciais para sua prática. Entretanto, os versados na técnica deveriam,
20 em face à presente descrição, apreciar que muitas mudanças podem ser
feitas nas modalidades específicas que são descritas e ainda obtêm um re-
sultado similar sem abandonar o espírito e escopo da invenção.

Exemplo 1

Métodos Gerais de Truncagem de Telômero

25 A truncagem cromossômica mediada por telômero é executada
pela introdução de seis cópias de repetições de telômero em um cromosso-
mo de planta endógena via um plasmídeo de transformação. Nesse caso
particular, as repetições de telômero foram feitas a partir de telômeros de
Arabidopsis previamente clonados por Richards e Ausubel (1988). Embriões
30 imaturos de milho Hill (Armstrong and Green, 1985) foram transformados
segundo os protocolos para transformação mediada por *Agrobacterium* com
um vetor binário padrão (Frame e outros, 2002). Durante a transformação

mediada por *Agrobacterium*, o DNA-T é protegido por proteínas VirD2 e VirE de *Agrobacterium*, e integrado no genoma de planta por um mecanismo de recombinação ilegítimo. Pequenos apagamentos podem ocorrer na maior parte das vezes na região de borda esquerda, e às vezes, na região de borda direita. Entretanto, esses apagamentos não destruirão a sequência de telômero. A presença das repetições de telômero trunca o cromossomo mediante integração. A truncagem de cromossomo associado a telômero foi demonstrada como ocorrendo, e foi usada para produzir minicromossomos em células de mamíferos (Farr e outros, 1991, 1992, 1995; Barnett e outros, 1993; Itzhaki e outros, 1992; Heller e outros, 1996; Mills e outros, 1999; Saffery e outros, 2001). Usando duas construções de truncagem cromossômica mediada por telômero, demonstrou-se que seis cópias de unidades de telômero de *Arabidopsis* diretas poderiam produzir a truncagem cromossômica em milho.

Duas construções binárias para truncagem cromossômica foram construídas para transformação de gene mediada por *Agrobacterium* de embriões imaturo de milho Hill (pWY76 e pWY86; ver figura 1). Noventa e três e oitenta e três linhas transgênicas foram recuperadas para pWY76 e pWY86, respectivamente. Um método de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (Kato e outros, 2004) foi usado para detectar transgenes em cromossomos de metáfase de plantas transgênicas T0. Um total de 123 sítios de integração de transgene para pWY76 e 107 sítios para pWY86 foram visualizados, com 54 e 55 sítios de integração localizados nos térmicos dos cromossomos. A absorção de pólen foi também observada em linhas transgênicas nas quais a truncagem cromossômica ocorreu. Ademais, os apagamentos de marcadores FISH distais em várias linhas transgênicas foram detectados por um coquetel de sonda de cariotipagem. Por exemplo, em uma linha transgênica pWY76, o braço curto 3 de cromossomo foi truncado. A análise Southern blot demonstrou padrões de mancha de hibridização, que é uma característica típica de telômeros heterogêneos recentemente semeados (Farr e outros, 1991). Esses estudos indicaram que as truncagens de cromossomo ocorreram nessas linhas transgênicas. Em contraste aos transgenes pWY76

e pWY86, duas outras construções sem as repetições de telômero foram também transformadas simultaneamente; entretanto, nenhuma truncagem cromossômica foi observada. Esses resultados indicaram que as repetições de telômero foram a causa da truncagem cromossômica.

5 Um minicromossomo derivado de cromossomo A foi encontrado em uma linha pWY86 por varredura FISH. Esse minicromossomo foi encontrado como originando do cromossomo 7 com a maior parte do braço longo apagado. Esse minicromossomo foi originalmente encontrado em uma linha tetraplóide sem cromossomos B. Como ocorreu em uma poliplóide, a deficiência causada pela truncagem do cromossomo foi compensada por seus homólogos em gametófitos diplóides. De fato, a típica absorção de pólen de 10 50% observada em linhas diplóides com uma deficiência de cromossomo não foi observada, e as progênies contendo esse minicromossomo foram recuperadas depois de cruzar o transformante recuperado por uma planta 15 diplóide, que reduziu o nível plóide a triplóide. O nível plóide foi então reduzido a diplóide mais o minicromossomo em ambos os fundos Hill e Mo17. Estudos adicionais mostraram que esse minicromossomo não causou quaisquer fenótipos anormais. O minicromossomo transmitiu em taxa de 38,5% (10/26) como macho quando cruzado com uma planta diplóide.

20 Construções de ácido nucléico para truncagem de telômero em plantas

Duas construções de truncagem e um controle menos telômero foram construídas usando o vetor binário pTF101.1 (Paz e outros, 2004) e usadas para a produção de minicromossomo (vide figura 1 para mapas de 25 construções). Os componentes nessas construções são listados em ordem como abaixo: pWY76: LB-Tvsp-Bar-2XP35S-*lox66*-GFP-Tnos-Pmas-HPT-Tmas-6x telomeres-RB, pWY86: LB-Tvsp-Bar-2XP35S-*lox71*-DsRed-Tnos-Pnos-*FRT*-FLP-Tnos-6x telômeros-RB e pWY96: LB-Tvsp-Bar-2XP35S-*lox71*-DsRed-Tnos-Pnos-*FRT*-FLP-Tnos-Pmas-HPT-Tmas-RB.

30 Os genes de fusão *lox71*-DsRed ou *lox66*-GFP sem promotor foram incluídos em pWY76 e pWY86, respectivamente, para permitir a integração específica de gene adicional no sítio *lox*. Em adição, um cassete

Pnos-FRT-FLP-Tnos foi incluído em pWY86 para permitir recombinação específica em sítio no sítio FRT para integração de gene adicional.

Exemplo 2

Truncagem de telômero em Cromossomos B

5 Para produzir minicromossomos B por truncagem cromossômica mediada por telômero, os cromossomos B de células de milho Black Mexican Sweet (BMS) foram introduzidos em uma linha A parente Hill de milho e permitidos a acumularem em múltiplas cópias. As duas construções de truncagem cromossômica associada a telômero foram misturadas com uma

10 construção pACH25 (Christensem e Quail, 1996) para direcionar embriões imaturos A parentes Hill ou híbridos Hill com múltiplos cromossomos B por transformação biolística (Frame e outros, 2000). O gene bar acionado por um promotor de utiquitina de milho na construção pACH25 habilita seleção suficiente de eventos transgênicos em meios suplementados com bialafos.

15 As seqüências de telômeros nas construções truncam cromossomos B bem como cromossomos A uma vez integrados nos cromossomos, assim ambos os minicromossomos a partir de cromossomos B e A truncados podem ser produzidos. Os cromossomos de metáfase de ponta de raiz obtidos a partir de plantas resistentes a herbicida regeneradas (T0) foram varridos por FISH

20 para minicromossomos. O plasmídeo pACH25 e uma construção pWY96 (vide Exemplo 1), que quase todas as outras seqüências de ambos pWY76 e pWY86 (vide abaixo) exceto a seqüência de telômero, são usados como sondas para varredura FISH. A sonda pWY96 pode eficientemente hibridizar com ambos os transgenes pWY76 e pWY86. Uma sonda de repetição de B

25 foi usada para identificar truncagens dos cromossomos B (Alfenito e Birchler, 1993). Quarenta e oito minicromossomos foram identificados; 41 dos quais foram a partir do cromossomo B enquanto 7 foram a partir de um cromossomo A. Todos os minicromossomos a partir dos cromossomos B foram transmissíveis e a maior parte deles foi recuperada na geração T1. Um tratamento de duplicação de cromossomo (Kato e Birchler, 2006) foi conduzido

30 em três minicromossomos A truncados para preservar os minicromossomos à medida que eles seriam perdidos de outra forma em meiose se mantidos

em um diplóide.

Exemplo 3

Expressão de Gene Cre por Transformação de Gene Mediada por *Agrobacterium* com um Sistema de Vetor BIBAC

5 O sistema de vetor BIBAC® foi adotado para transformação de milho com uma grande parte de material genético incluindo um gene marcador de resistência a herbicida, um DNA genômico de levedura 30 kb como um marcador por hibridização in situ por fluorescência (FISH), e um cassete de 35S-lox-Cre recombinação. Brevemente, o plasmídeo de transformação
10 de gene BIBAC pJV21 foi construído como segue. O vetor pCH20 (Hamilton, 1997) foi modificado para apagar o BamHI para fragmento SwaI. O sítio BamHI foi reconstituído adicionando-se um ligador BamHI no sítio SwaI seguido com digestão BamHI e religação. O plasmídeo resultante é chamado pJV06. Um fragmento HindIII/SalI 3,4 kb contendo o cassete de expressão
15 de gene 35S-lox-Cre a partir de pED97 foi clonado no sítio BamHI por ligação de extremidade abrupta para fazer pJV08. A seguir, uma seqüência de telômero de 400 bp e um cassete e expressão de gene ubi-bar a partir de pAHC25 (Christensen e outros, 1992) foram montados em pBLUESCRIPT™ (Stratagene, La Jolla, Califórnia) e então clonados no sítio SrfI de pJV08 por
20 ligação de extremidade abrupta para fazer pJV15 no qual a seqüência de telômero foi localizada na borda esquerda do vetor binário. O gene ubi-bar foi usado como um marcador de seleção para esses estudos. A seqüência de telômero TTTAGGG (SEQ ID NO:1) foi orientada em direção à borda esquerda. Outra seqüência de telômero de 400 bp foi clonada no sítio PacI por
25 ligação de extremidade abrupta para fazer uma repetição direta dos 800 bp da seqüência de telômero na LB. O clone foi seqüenciado para confirmar a orientação da repetição de telômero. UM DNA de levedura de 3 kb de BIBAC1 (Hamilton, 1997; Hamilton e outros, 1996) foi então clonado no sítio NotI para fazer pJV21 (FIG. 2). As construções foram transformadas para
30 cepas de *Agrobacterium* LBA4404 por eletroporação de células competentes seguindo as instruções do fabricante (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, Califórnia). Nessa construção, um cassete 35S-lox66-Cre foi clonado adjacente

à borda direita de modo a localizar o sistema de recombinação específico em sítio Cre/lox no genoma por transformação de gene.

Transformação Genética

Uma transformação de gene mediada por *Agrobacterium* foi executada com a construção pJV21 para transformar embriões imaturos de plantas Hill com 0 a 12 cromossomos B. Setenta e cinco linhas transformadas foram recuperadas. Os transgenes foram confirmado por hibridização Southern e FISH (Kato e outros, 2004). Em 60 linhas caracterizadas por hibridização Southern, 45 linhas tiveram um único transgene cópia. Sessenta e três das 75 linhas transgênicas tiveram um único transgene se determinado por FISH. A integridade do transgene foi analisada por hibridizações Southern blot em ambas as extremidades esquerda e direita da região de DNA-T usando sondas do gene bar e do gene Cre, respectivamente. Nas 75 linhas que foram analisadas, 52 linhas transgênicas foram encontradas como tendo o mesmo número de cópia em ambas a borda esquerda e direita, indicando que os transgenes nesses casos estão intactos.

Integração de um transgene na região de telômero

Um evento transgênico J11-9 mostrou um padrão de mancha de hibridização Southern se comparada aos outros que têm bandas discretas. O padrão de mancha de hibridização é uma marca de telômeros que resultou da atividade de telômeros ou neo-telômeros normal semeados durante uma truncagem cromossômica mediada por telômero, porque a telomerase adiciona números diferentes do motivo telomérico TTTAGGG; (SEQ ID NO:1) em diferentes células (Farr e outros, 1991; Richards e Ausubel, 1988). Para demonstrar a natureza terminal desse transgene, múltiplas enzimas de restrição que cortam a região distal do transgene exatamente precedendo os 800 bp de repetição de telômero foram usadas para digerir o DNA genômico J11-9, e uma hibridização Southern foi executada com uma sonda de gene bar rotulada 32P (Yu e outros, 2006b). Os padrões de mancha de hibridização deslocada de acordo com as distâncias entre os três sítios de corte de enzima de restrição (*Xba*I, *Xho*I e *Dra*I) e as extremidades teloméricas do cromossomo. Por exemplo, a enzima mais proximal *Dra*I gerou o padrão de

mancha maior na faixa de mais de 6 kb, enquanto um XbaI mais distal gerou padrões de mancha na faixa de 3,2 a 4,6 kb e o XhoI produziu manchas entre 5 a 6 kb. Em contraste, a clivagem em um sítio HindIII mais proximal produziu uma banda discreta. Uma banda discreta seria gerada se houvesse um sítio HindIII distal para a sonda de gene bar. Esse sítio HindIII estava provavelmente presente no telômero natural porque esse sítio não foi encontrado em nossa seqüência de dados da construção pJV21. Assim a posição final do transgene em J11-9 foi potencialmente o resultado de um evento de integração nos telômeros ao invés de uma formação de telômero de novo. Em adição, nenhum crescimento anormal, esterilidade de gametófito, ou transmissão reduzida foi observado nas plantas J11-9, indicando que não há perda de material genético funcional causada por esse transgene, um fenômeno freqüentemente observado em plantas transgênicas com truncagens cromossômicas (Yu e outros, 2006b).

A localização final desse transgene foi também revelada por uma análise citológica. Os cromossomos de pontas de raiz J11-9 foram hibridizados com uma sonda de DNA de 30 kb rotulada fluorescina-dUTP misturada com um coquetel de cariotipagem (Kato e outros, 2004). Os cariótipos de recipientes de transformação Hill foram produzidos com esse coquetel (Yu e outros, 2006a). O transgene foi identificado na extremidade do braço de cromossomo 3L.

Posição e Distribuição de transgenes

A análise FISH foi estendida a todas as linhas transgênicas de modo a traçar um perfil das posições e distribuições de transgene. Os transgenes foram encontrados em cada cromossomo no cariótipo (Tabela 2) e sítios de integração foram encontrados dentro ou próximo a telômeros, centrômeros, regiões eucromáticas, nós heterocromáticos e regiões NOR por FISH. Todos os braços do cromossomo foram incluídos exceto 8S e 10S. Os transgenes foram distribuídos aleatoriamente entre os 10 cromossomos A com mais números em grandes cromossomos, e menos números em pequenos cromossomos como esperado. Entretanto, nenhum transgene foi observado em qualquer cromossomo B embora houvesse até 12 cromosso-

mos B ("Bs") presentes (média 3,9) nas plantas transformadas.

Tabela 2: Eventos transgênicos com a construção pJV21 de milho por transformação mediada por *Agrobacterium*

Linha Trans.	Bs	Southern		FISH	Atividade Cre	Localização do cromossomo
		bar	Cre	Y30		
10-1	4	1	1	1	+	1L, Satélite
10-2	5	1	1	1	+	1S
10-3	1	1	1	1	+	1S, Distal
10-4	3	1	1	1	+	1S
10-5	3	1	2	1	+	5S, Distal
10-6	4	1	0	1	+	6L
10-7	2	1	0	1	-	10L, Muito Distal
11-1	4	1	1	1	+	7L, Cent.-Nó-Y30
11-2	0	1	1	2	+	2L+7L, 2L=Sat.-Y30-5SRNA, 7L=Distal
11-3	6	3	3	3	+	2C + 4S + 5L, 2C = Centromérico, 4S = Satélite, 5L = Intermediário
11-5	3	1	1	1	+	5L, Sat.-Y30-Nó
11-6	4	1	2	1	+	2S, Cent.-Y30-Sat.
11-7	6	1	1	1	+	1L
11-8	3	2	3	1	+	1S, Cent.-Y30-Nó
11-9	5	1	1	2	+	3L+5L, 3L = Muito Distal, 5L = Distal
11-10	8	1	0	1	-	10L, Distal
11-11	3	2	1	1	+	7L, Nó
11-12	1	1	1	1	+	1L, Distal
11-13	2	1	1	1	+	7L, Distal
11-14	4	1	1	1	+	1L
11-15	3	3	1	1	+	1S, Intermediário
11-16	4	3	1	1	+	6L, Intermediário
11-17	6	2	2	2	+	7L+7S, 7L=Cent.-Y30-Nó
11-18	6	1	2	1	+	3S, Distal
11-19	2	1	1	1	+	7L
11-20	5	1	1	1	+	9S, Cent.-Y30-Nó
11-21	5	3	0	1	-	2C, Centromérico
11-22	3	2	0	1	-	
11-23	8	1	2	1	+	1L, Satélite
11-24	7	1	1	1	+	7L
11-25	7	1	1	1	+	3L, Distal
11-26	2	2	2	2	+	2L+9L, 2L = Intermediário, 9L = Distal
11-27	6	1	1	1	+	10L, Distal
11-28	4	1	1	1	+	5L, Distal

Continuação

Linha Trans.	Bs	Southern		FISH	Atividade Cre	Localização do cromosomo
		<i>bar</i>	Cre	Y30		
11-29	9	1	2	1	+	3S, Distal
11-30	1	1	1	1	+	5L, Nó
11-31	4	1	1	2	+	7L+10L, 7L = Nó, 10L = Muito Distal
11-32	2	1	1	1	+	4L, Distal
12-1	6	1	1	2	+	2L+7S
12-2	3	3	3	1	-	3S
12-3	11	2	2	2	+	4L, Intermediário
12-4	6	1	1	1	+	9L, Distal
12-5	5	1	2	1	+	7L, Distal
12-6	0	1	1	1	+	8L, Muito Distal
12-7	2	1	1	1	+	5L
12-8	0	1	2	1	+	1L+3L+6S, 1L=Distal a Sat.
12-9	2	1	1	1	+	4S, Proximal a Sat.
12-10	1	1	1	1	+	2S, Distal
12-11	5	1	1	1	+	9L, Intermediário
12-12	0	1	1	1	+	5L, Distal
12-13	2	1	1	1	+	4S, Cent.-Y30-Sat.
12-14	2	1	1	1	+	8L, Nó
12-15	2	1	0	1	+	4L, Intermediário
12-16	11	1	1	1	+	3L, Intermediário
12-17	6	1	1	1	+	4L, Intermediário
12-18	6	1	1	1	+	5L, Intermediário
12-19	4	3	3	1	+	6L, Distal
12-20	6	4	2	2	+	1L+10L, 1L = No Sat., 10L = Distal
12-21	0	2	1	1	+	2L, Intermediário
12-22	3	2	1	1	+	3L, Intermediário
12-23	1	1	0	0	-	
12-24	7	1	1	1	+	8L, Nó
12-25	4	1	2	1	+	2L, Cent.-Sat.-Y30
12-26	5	1	1	1	+	10L, Distal
12-27	9	1	1	1	+	1S, Intermediário
12-28	3	1	1	1	+	
12-29	2	1	1	1	+	3L, Intermediário
12-30	5	1	0	1	+	1L
12-31	4	1	1	1	+	6S, NOR
12-32	4	1	1	1	+	3S, Distal
12-33	2	1	1	1	+	3L, Intermediário
12-34	3	1	1	1	+	2S, Distal
12-35	4	1	1	1	-	8L, Cent.-Y30-Nó
12-36	0	1	1	1	+	8L

Continuação

Linha Trans.	Bs	Southern		FISH	Atividade	Localização do cromosomo
		<i>bar</i>	Cre	Y30	Cre	
12-37	2	1	1	2	+	1S+6L, 1S = Nó, 6L = Distal

Sistema de recombinação específica em sítio Cre/lox

A transformação com 84 transgenes localizados na construção BIBAC aleatoriamente no genoma de milho. Esses transgenes são na maior parte intactos como indicado por hibridizações Southern. Noventa e um sítios transgênicos foram detectados em 75 linhas transgênicas por hibridizações Southern com uma sonda de gene Cre (Tabela 2). Para demonstrar que esses transgenes Cre foram expressos e funcionais, uma construção de repórter pHK52 (Srivastava *e outros*, 1999) foi biolisticamente liberada nos embriões imaturos da progênie das plantas transgênicas. A construção p-HL52 contém um gene beta-glucuronidase (GUS) orientado anti-senso sob o promotor de ubiquitina de milho. O gene GUS anti-senso é flanqueado por repetições invertidas do sítio loxP. O gene GUS anti-senso revertido para a orientação senso e expresso na presença de uma Cre recombinase que catalisa a invenção de elementos genéticos flanqueados por repetições invertidas de sítios lox. Um ensaio GUS transiente foi executado em embriões bombardeados de todas as linhas transgênicas. Esse estudo demonstrou que o gene Cre foi funcional em 68 linhas (Tabela 2). Uma população de embriões foi segregadas para o transgene em um fluxo gênico de J11-9 para a linha Hill. A expressão de GUS foi ativada em 30 de um total de 50 embriões, uma relação ~1:1.

Exemplo 4Truncagem de Telômero de Cromossomos B por Transformação de Bombardeamento de Partícula

Como o cromossomo B tem muitas propriedades que o tornam preferencial como um minicromossomo, estudos adicionais foram executados para determinar se os minicromossomos de planta derivados de cromossomos B podem ser eficientemente gerados. As construções de trunca-

gem de telômero, pWY76 e pWY86 (FIG. 1) foram usadas nesses estudos. Adicionalmente, o plasmídeo pWY86-bar foi feito digerindo pWY86 com PmlI/AvrII e autoligação para apagar o cassete de expressão de gene 35S-bar. O plasmídeo pAHC25 usados nos estudos foi previamente descrito por
5 Christensen e Quail (1996).

Brevemente, embriões imaturos entre 1,2 a 2,0 mm foram dissecados assepticamente em uma capota de fluxo. A transformação de gene mediada por biolística de embriões imaturos de milho foi conduzida como descrito por Songstad e outros (1996) e Frame e outros (2000). Os embriões
10 imaturos foram localizados com a face para baixo em meios de iniciação de calus com sais e vitaminas N6 (Chu e outros, 1975) suplementados com 2,0 mg/l de 2,4-D, 100,0 mg/l de mio-inositol, 2,8 g/l de prolina, 30,0 g/l de sacarose, 100,0 mg/l de hidrolisato de caseína, 3,0 g/l de GELRITE, 25 µM de nitrato de prata, PH 5,8. Os embriões foram induzidos em 28°C por 2-4 dias,
15 então transferidos para meios osmóticos com sais N6 e vitaminas suplementados com 2,0 mg/l de 2,4-D, 100,0 mg/l de mio-inositol, 0,7 g/l prolina, 30,0 g/l de sacarose, 100,0 mg/l de hidrolisato de caseína, 36,4 g/l de sorbitol, 36,4 g/l de manitol, 3,0 g/l de GELRITE, 25 µM de nitrato de prata, pH 5,8 para tratamento osmótico de 4 horas antes de bombardeamento.

Os plasmídeos foram preparados com um kit de miniprep Qiagen (Qiagen, Valencia, Califórnia). Três miligramas de partículas de ouro de 0,6 µ (BIO-RAD, Hercules, Califórnia) foram revestidos com a mistura de 1 µg de plasmídeo de truncagem de telômero (pWY76, pWY86, ou pWY86-bar) e 0,25 µg de pAHC25. O bombardeamento foi executado com a arma
20 biolística 1000/He PDS (BIO-RAD) usando os seguintes parâmetros: pressão de disco de ruptura de 4,48 mPa (650 psi), distância alvo de 6 cm, lacuna de 6 mm, 1,2 cm de macro-carreador para placa de bloqueio, e vácuo em ruptura de 28 Torr.

Os embriões bombardeados nos meios osmóticos foram envolvidos com PARAFILM e incubados a 28°C ao longo da noite e então transferido a meios de iniciação de calus na manhã seguinte.

Análise FISH de minicromossomos em plantas transgênicas

As plantas transgênicas T0 foram varridas para minicromossomos por FISH como descrito acima. As sondas de pWY96 e pAHC25 foram rotuladas com Texas red dCTP por tradução de corte (Kato e outros, 2004) e hibridizadas para transgenes. A seqüência de repetição B (Alfenito e Birchler
5 1993) foi rotulada com Alexa Fluor-488 dCTP, e misturada com ou sondas de transgene pWY96 ou pAHC25 para varrer os cromossomos B transformados por transformação mediada por biolística. As sondas CentC (Ananiev e outros, 1998) e NOR (Stein e outros, 1998) foram rotuladas com Alexa Fluor-488 dCTP (Invitrogen); CRM (Zhong e outros, 2000) foi rotulado com
10 Cy5-dCTP. Os minicromossomos foram identificados por seu tamanho se comparado a cromossomos tipo A ou B normais. FISH de células meióticas foi executado como descrito por Gao e outros (1999) e Yu e outros (2006). A repetição de B foi rotulada com Texas red dCTP e a seqüência de nó (14) foi rotulada verde com Alexa Fluor-488 dCTP.

15 Duzentos e oitenta e um eventos transgênicos foram regenerados a partir de calus de resistência a bialafos (67 com pWY76, 87 com pWY86, e 127 com pWY86-bar). FISH revelou que quarenta e um eventos tiveram transgenes em cromossomos B, que incluíam 24 minicromossomos com transgenes distais e 20 cromossomos B intactos com transgenes inter-
20 nos. Adicionalmente, 5 translocações A-B e 1 B-A, e 7 fragmentos de cromossomos A foram identificados. Finalmente, 10 derivados de cromossomo B truncados sem sinais de transgene foram também identificados. Esses eventos foram provavelmente produzidos quando truncagem cromossômica mediada por telômero ocorreu em tal orientação que os transgenes são reti-
25 dos em fragmentos acêntricos e são perdidos durante mitose. Esses minicromossomos seriam perdidos durante a seleção no processo de transformação se eles não foram suportados por transgenes adicionais no mesmo evento. Assim, esses minicromossomos foram menos em número do que aqueles com transgenes.

30 Medição de tamanho de minicromossomo

Para medir o tamanho da repetição de centrômero B de 86B23, os canais verdes de 10 imagens de cromossomo de metáfase que tem repe-

tição B rotulada verde foram importados do programa Fujifilm Image Gauge V3.3 (Fuji, Tóquio, Japão). A quantidade do centrômero de minicromossomo e aquela de um centrômero de cromossomo B normal foram medidas e a relação do centrômero de minicromossomo para aquela de um B normal foi calculada a partir de cada célula individual. A relação média e o desvio padrão foram calculados. Para medir o tamanho do cromossomo de 86B23, os cromossomos paquítenos foram manchados com 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), imagens foram capturadas via um microscópio de fluorescência Zeiss (Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Alemanha) e importadas para o programa Fujifilm Image Gauge (Fuji). Os comprimentos do minicromossomo e do cromossomo B normal foram medidos, e sua relação foi calculada. Os tamanhos de outros minicromossomos foram estimados visualmente com base em sua aparência se comparado àqueles cromossomos B normais na mesma célula. As comparações de tamanho de vários cromossomos B truncados são mostradas na Tabela 3.

Teste de transmissão de minicromossomos

Os resultados desses estudos mostraram que a transmissão de minicromossomos durante a meiose varia (Tabela 3). A transmissão de um R2 univalente (34,8% de autopolinização) foi comparável a um isocromossomo previamente reportado 8S•8S (37,5%) (Yu e outros, 2006). A transmissão de minicromossomos tipo B varia de 12% (86-74) a 39% (76-15a) via o parente macho (Tabela 3). A transmissão de minicromossomos foi afetada por muitos fatores, tais como um limite de tamanho de cromossomo (Schubert, 2001; Spence e outros, 2006). Sabe-se também que o tamanho e a estrutura do centrômero B podem afetar a transmissão de derivados de cromossomo B (Kaszas e Birchler 1998). A maioria dos minicromossomos derivados do cromossomo B passou por não-disjunção na presença de cromossomos B normais. A região distal do braço longo do cromossomo B e o centrômero são responsáveis por não-disjunção de cromossomos B (Carlson 1978). Por exemplo, na presença de cromossomos B normais, os parentes macho transmitiram 2 cópias de minicromossomos à progênie (Tabela 3). Essa propriedade de minicromossomos tipo B fornece um mecanismo para

criar uma série de dosagem dos minicromossomos para expressão aumentada de genes de interesse.

Tabela 3: Tamanhos e taxas de transmissão de minicromossomo B

Eventos	76-15a	86-74	86B23	86B155	R2
Tamanho de cromossomo	1/2 B	1/5 B	1/20 B	3/4 B	NM
Localização de Transgene	distal	distal	distal	distal	distal
Cruzamento	como macho	como macho	como macho	auto	auto
Transmissão	14/36	3/25	7/29	9/18	15/46
Transmissão*	30/36	6/25	8/29	16/18	16/46

NM indica não medido. * Número de progênie com minicromossomos/ número de progênie testado. ** Número de minicromossomos transmitidos/número de progênie testado.

Ensaio GUS histoquímico em indivíduos de transgenes em cromossomos B e derivados

Como com cromossomos B supernumerários de outros organismos, o cromossomo B de milho é inerte sem quaisquer genes ativos detectados (Jones, 1995). Entretanto, sabe-se se a ausência de atividade de gene em cromossomos B é causada pela ausência de genes ou por causa da supressão de transcrição de gene pelo cromossomo B devido a sua natureza heterocromática. A transformação do cromossomo B em milho é usada para determinar se há supressão de expressão de transgene. Nesse estudo, 17 eventos transgênicos foram gravados, os quais tiveram somente transgenes em cromossomos B. Isso indicou que eles foram provavelmente suportados pela expressão de genes bar transgênicos a partir de cromossomos B, embora foi possível que os transgenes em cromossomos A estivessem presentes, mas fossem muito pequenos para serem detectados pelo método FISH. A expressão de gene GUS de 9 desses eventos foi determinada pelo ensaio do calus resistente. A ausência de expressão GUS a partir de outros eventos pode ser atribuída ou ao silenciamento do gene GUS ou à ausência de um cassete de gene GUS intacto durante o processo de transformação. Entretanto, em pelo menos 6 eventos, a expressão de gene GUS foi atribuída aos transgenes no cromossomo B ou derivados (Tabela 4). Nesses casos, as raízes primárias germinadas da segregação de progênie foram testadas para

expressão de GUS. Por exemplo, na progênie de 76-15a, 76-15b e 86-74 de fluxo gênico para plantas de cepa recipiente, toda a progênie que teve transgenes no cromossomo B ou derivados truncados (14, 11 e 3 indivíduos, respectivamente) expressaram GUS, mas nenhum deles que não tiveram transgenes nos cromossomos B ou derivados (22, 19 e 22 indivíduos, respectivamente) expressou GUS. Em progênie de autopolinizado 86B23 que teve o minicromossomo menor, 23 dos 25 indivíduos que tiveram transgenes nos minicromossomos expressaram GUS, mas nenhum dos 26 que não tiveram o minicromossomo mostrou expressão de GUS. A ausência de expressão de GUS a partir de progênie carecendo de transgenes no cromossomo B e derivados demonstrou que a expressão de GUS foi dos transgenes no cromossomo B ou derivados e não de eventos de cromossomo A não detectados. Assim, os transgenes inseridos nos cromossomos B foram expressos, pelo menos naqueles sítios que foram testados. Esses sítios parecem ser aleatoriamente distribuídos ao longo do cromossomo B a partir do centrômero até a extremidade do braço longo do cromossomo B.

Tabela 4: Expressão de transgene em minicromossomos B

Eventos	76-15a	76-15b	86-74	86B23	86B155	76-10	86-14
Tamanho de cromossomo	1/2 B	1B	1/5 B	1/20 B	3/4 B	1 B	1 B
Localização de Transgene	distal	interna	distal	distal	distal	distal	centrômero
GUS+	14	11	3	23	7	2	16
Total	14	11	3	25	9	12	23
%	100,0	100,0	100,0	92,0	77,8	16,7	69,6

O ensaio histoquímico de expressão de gene GUS foi executado de acordo com Jefferson e outros (1987) por um kit de manchamento de GUS (Sigma, St. Louis, MO). Calus ou raízes de corte de 2 a 5 mm de comprimento foram localizados diretamente em uma solução de manchamento GUS de 50 µl arranjada em uma placa PCR de 96 cavidades. A placa foi envolta com PARAFILM e incubada a 37°C por 1 hora.

Recombinação entre J11-9 e R2

Para demonstrar o uso de minicromossomos como uma plataforma AC, o sítio lox no minicromossomo R2 foi testado para troca catalisada

de Cre. Uma planta transgênica J11-9 com um cassete de expressão 35S-lox66-Cre de transgene distal foi cruzada com uma fêmea por R2, que contém um gene *lox71-DsRed* (Clontech, Mountain View, Califórnia) sem promotor. Lox6 e lox71 são sítios de recombinação lox mutantes que podem recombinar mais favoravelmente na reação dianteira, como descrito acima. A recombinação bem sucedida dos dois transgenes resulta na troca das regiões distais dos dois transgenes e na adição de material genético ao minicromossomo R2 a partir de J11-9. A recombinação pode ser monitorada pela reação recíproca que localiza o gene DsRed sem promotor sob o controle de promotor 35S, assim produzindo uma proteína de fluorescência vermelha reconhecível. Os eventos de recombinação foram varridos em raízes primárias de mudas germinadas usando um microscópio estéreo de fluorescência com um filtro vermelho Texas. Quatro plantas foram identificadas com base no ensaio de fluorescência a partir de um total de 44 progênies F1 de um cruzamento de heterozigotos J11-9 por heterozigotos R2. Aproximadamente 8,7% da progênie (aproximadamente 4 plantas) deveria ter ambos dos transgenes baseados na transmissão de R2 (Tabela 4) e J11-9.

Para determinar se a fluorescência vermelha foi um resultado de recombinação específica em sítio, DNA genômico foi isolado de cada uma das 4 plantas que expressaram fluorescência vermelha, e foi usado como modelos para amplificação PCR através de ambos os produtos de recombinação predita. Os produtos amplificados foram seqüenciados e a recombinação no sítio lox foi confirmada em cada caso. As configurações das regiões seqüenciadas combinaram com os padrões esperados. Assim, esse minicromossomo foi demonstrado como sendo amenizável para manipulações genéticas via um sistema de recombinação específico em sítio, e pode servir como um protótipo de minicromossomo com base em cromossomos artificiais (ACs).

Referências

As referências listadas abaixo são incorporadas aqui por referência dado que elas suplementam, explicam, fornecem um fundo, ou ensinam metodologia, técnicas, e/ou composições empregadas aqui.

- Patente U.S. 3.710.511
Patente U.S. 3.861.709
Patente U.S. 4.654.465
Patente U.S. 4.727.219
5 Patente U.S. 4.769.061
Patente U.S. 4.810.648
Patente U.S. 4.940.835
Patente U.S. 4.959.317
Patente U.S. 4.975.374
10 Patente U.S. 5.270.201
Patente U.S. 5.322.789
Patente U.S. 5.445.961
Patente U.S. 6.262.341
Patente U.S. 5.445.961
15 Patente U.S. 5.527.695
Patente U.S. 5.530.191
Patente U.S. 5.538.880
Patente U.S. 5.550.318
Patente U.S. 5.625.132
20 Patente U.S. 5.658.772
Patente U.S. 5.684.242
Patente U.S. 5.689.041
Patente U.S. 5.733.744
Patente U.S. 5.736.369
25 Patente U.S. 5.741.684
Patente U.S. 5.929.301
Patente U.S. 6.175.058
Patente U.S. 6.187.994
Patente U.S. 7.015.372
30 *Abe e outros, J. Biol. Chem.*, 262:16793, 1987.
Abremski e outros, Cell, 32(4):1301-1311, 1983.
Albert e outros, Plant J., 7:649-659, 1995.

- Alfenito e Birchler, *Genetics*, 135:589-597, 1993.
- Ananiev e outros, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:13073, 1998.
- Araki e outros, *J. Mol. Biol.*, 225(1):25-37, 1992.
- Araki e outros, *Nucleic Acids Res.*, 25(4):868-872, 1997.
- 5 Armstrong e Green, *Planta*, 164:207-214, 1985.
- Aronel e outros, *Science*, 258(5086):1353-1355, 1992.
- Barnett e outros, *Nucleic Acids Res.*, 21:27-36, 1993.
- Beachy e outros, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28:451, 1990.
- Brock e Pryor, *Chromosoma*, 104:575-584, 1996.
- 10 Chang, In *Plant Breeding in the 1990s*, Stalker e Murphy (Eds.), Wallingford, U.K., CAB International, 17-35, 1992.
- Chase e Gabay-Laughnan, In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, Daniell e Chase, (Eds.), pp. 593-621, 2004.
- Christensen e outros, *Plant Molecular Biology*, 18:675-689, 1992.
- 15 Choi e outros, *Nucleic Acids Res.*, 28(7):E19, 2000.
- Christensen e Quail, *Transgenic Res.*, 5:213-218, 1996.
- Chu e outros, *Sci. Sin.*, 18:659, 1975.
- Conger e outros, *Plant Cell Reports*, 6:345-347, 1987.
- Cox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(14):4223-4227 1983.
- 20 Craig, *Ann. Rev. Genetics*, 22:77-105, 1988.
- Dale e Ow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23):10558-10562, 1991.
- Day e outros, *Genes Dev.*, 14(22):2869-2880, 2000.
- DeGreef e outros, *Bio/Technology*, 7:61, 1989.
- Duncan e outros, *Planta*, 165:322-332, 1985.
- 25 Duvick, *Adv. Genet*, 13:1-56, 1965.
- Elliot e outros, *Plant Molec. Biol.*, 21:515, 1993.
- Enomoto, e outros, *J. Bacteriol.*, 6(2):663-668, 1983.
- Pedido Europeu 0 160 390
- Pedido Europeu 0 242 246
- 30 Pedido Europeu 0 333 033
- Pedido Europeu 0 616644
- Pedido Europeu 1 035 208

- Farr e outros, *Embo J.*, 14:5444-5454, 1995.
- Farr e outros, *Nat. Genet.*, 2:275-282, 1992.
- Farr e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7006-7010, 1991.
- Fisher e outros, *Plant Physiol.*, 102(3):1045-1046, 1993.
- 5 Fox e outros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(6):2486-2490, 1993.
- Frame e outros, *Dev. Biol. -Plant*, 36:21-29, 2000.
- Frame e outros, *Plant Physiol.*, 129:13-22, 2002.
- Fukushige e Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(17):7905-7909 1992.
- Futcher, *Yeast*, 4(1):27-40, 1988.
- 10 Gabay-Laughnan e outros, *Genetics*, 166:959-970, 2004.
- Gao e outros, *Acta Botanica Sinica*, 41, 1999.
- Geiser e outros, *Gene*, 48:109, 1986.
- Gleen e outros, *Plant Molec. Biology*, 18:1185-1187, 1992.
- Golic e Lindquist, *Cell*, 59(3):499-509, 1989.
- 15 Golic, *Genetics*, 137(2):551-563, 1994.
- Gordon-Kamm e outros, *The Plant Cell*, 2:603-618, 1990.
- Green e Rhodes, *Maize for Biological Research*, 367-372, 1982.
- Hamilton e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9975-9979, 1996.
- Hamilton, *Gene*, 200:107-116 1997.
- 20 Hammock e outros, *Nature*, 344:458-461, 1990.
- Hayes e outros, *Biochem. J.*, 285(Pt 1):173-180, 1992.
- Heller e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7125-7130, 1996.
- Hoess e outros, *Nucleic Acids Res.*, 14(5):2287-2300, 1986.
- Hoess e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:3398, 1982.
- 25 Huang e outros, *J. Bacteriol.*, 179(19):6076-6083 , 1997.
- Huang e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5292-5296, 1991.
- Huub e outros, *Plant Molec. Biol.*, 21:985, 1993.
- Ito e outros, *Nuc. Acid Res.* 10:1755. 1982.
- Itzhaki e outros, *Nat. Genet.*, 2:283-287, 1992.
- 30 Jefferson e outros, *EMBO J.*, 6:3901, 1987.
- Jiang e outros, *Trends in Plant Sci.*, 8:570-575, 2003
- Jones e Rees, *B Chromosomes*, Academic Press, NY, 1982.

- Jones e outros, *Science*, 266:7891, 1994.
- Jones, *New Phytol.*, 131:411, 1995.
- Kaszas e Birchler, *Genetics*, 150:1683, 1998.
- Kato e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:13554-13559, 2004.
- 5 Kato e outros, *Cytogenet Genome Res*, 109:156-165, 2005.
- Kato e Birchler, *J. Hered.*, 97:39-44, 2006.
- Kirihara e outros, *Gene*, 71(2):359-370, 1988.
- Knutzon e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(7):2624-2628, 1992.
- Langer e outros, *Nucleic Acids Res.*, 30(14):3067-3077, 2002.
- 10 Lee e Saito, *Gene*, 216(1):55-65, 1988.
- Lee e outros, *EMBO J.*, 7(5):1241-1248, 1988.
- Liu e outros, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96:6535-6540, 1999.
- Logemann e outros, *Bio/technology*, 10:305, 1992.
- Maeser e Kahmann, *Mol. Gen. Genet.*, 230(1-2):170-176, 1991.
- 15 Mariani e outros, *Nature*, 347:737-741, 1990.
- Mariani e outros, *Nature*, 357:384-387, 1992.
- Marshall e outros, *Theor. App. Genet.*, 83:435, 1992.
- Martin e outros, *Science*, 262:1432, 1993.
- McClintock, *Genetics*, 23:215-376, 1938.
- 20 McDonough e outros, *J. Biol. Chem.*, 267(9):5931-5936, 1992.
- Medberry, e outros, *Nucleic Acids Res.*, 23(3):485-490, 1995.
- Meyer-Leon e outros, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 49:797-804, 1984.
- Miki e outros, *Theor. App. Genet.*, 80:449, 1990.
- 25 Mills e outros, *Hum. Mol. Genet.*, 8:751-761, 1999.
- Mindrinos e outros, *Cell*, 23;78(6):1089-1099, 1994.
- Murray e Szostak, *Nature*, 305:189-193, 1983.
- Murray e Szostak, *Mol Cell Biol*, 6:3166-3172, 1986.
- Nasuda e outros, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:9842-9847, 2005.
- 30 O'Gorman e outros, *Science*, 251(4999):1351-1355, 1991.
- Ogilvie e outros, *Science* 214:270, 1981
- Onouchi e outros, *Nucleic Acids Res.*, 19(23):6373-6378, 1991.

- Onouchi e outros, *Mol. Gen. Genetics*, 247:653-660, 1995.
- Ow, *Curr. Op. Biotech.*, 7:181-186, 1996.
- Page e outros, *Genetics*, 159:291-302, 2001.
- Paz e outros, *Euphytica*, 136:167-179, 2004.
- 5 Pedido PCT US93/06487
 Pedido PCT WO 01/11058
 Pedido PCT WO 01/40492
 Pedido PCT WO 91/13972
 Pedido PCT WO 98/44140
- 10 PCT Appn. WO 95/06128
 Pen e outros, *BioTechnology*, 10:292, 1992.
 Przibilla e outros, *Plant Cell*, 3:169, 1991.
 Raboy e outros, *Maydica*, 35:383, 1990.
 Rao e outros, In: *Somatic Embryogenesis in Glume Callus Cultures*, Maize
 Genetics Cooperation Newsletter #60, 1986.
- 15 Reddy e outros *Plant Mol. Biol.*, 22(2):293-300, 1993.
 Richards e Ausubel, *Cell*, 53(1):127-136, 1988.
 Rieder, *Int. Rev. Cytol.*, 79:1-58, 1982.
 Sadowski, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 51:53-91, 1995.
- 20 Saffery e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:5705-5710, 2001.
 Sauer e Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(14):5166-5170, 1988.
 Sauer, *Biotechniques*, 16(6):1086-1088, 1994.
 Sauer, *Methods*, 14(4):381-392, 1998.
 Sauer, *Mol. Cell Biol.*, 7(6):2087-2096, 1987.
- 25 Schubert, *Cytogenet Cell Genet*, 93:175, 2001.
 Senecoff e outros, *J. Mol. Biol.*, 201(2):405-421, 1988.
 Sergaard e outros, *J. Biol. Chem.*, 268:22480, 1993.
 Sharopova e outros, *Plant Mol Biol* 48:463-81, 2002.
 Shen e outros, *Hum Mol Genet*, 6:1375-1382, 1997.
- 30 Shen e outros, *Curr Biol*, 10:31-34, 2000.
 Shinohara e outros, *Chromosome Res*, 8:713-725, 2000.
 Shiroza e outros, *J. Bacteriol.*, 170:810, 1988.

- Songstad e outros, *Plant Cell Reports*, 7:262-265, 1988.
- Songstad e outros, *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant*, 32:179, 1996.
- Spence e outros, *Chromosoma*, 115:60, 2006.
- Srivastava e outros, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96:11117-11121, 1999.
- 5 Stein e outros, *The Plant Journal* 13:281, 1998.
- Steinmetz e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 20:220, 1985.
- Sumitani e outros, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57:1243, 1993.
- Tavladoraki e outros, *Nature*, 366:469, 1993.
- Taylor e outros, Seventh Int'l Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions (Edinburgh, Escócia) Abstract #497, 1994.
- 10 Trinh e Morrison, *J. Immunol. Methods*, 244(1-2):185-193, 2000.
- Tomizuka e outros, *Nat Genet*, 16:133-143, 1997.
- Tomizuka e outros, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 722-727, 2000.
- Van Damme e outros, *Plant Molec. Biol.*, 24:25, 1994.
- 15 Van Hartingsveldt e outros, *Gene*, 127:87, 1993.
- Voet e outros, *Genome Res*, 11:124-136, 2001.
- Wallace e outros, *Nuc. Acids Res.*, 28(6):1455-1464, 2000.
- Yu e outros, *Genome*, 49:700, 2006.
- Zheng e outros, *Genetics*, 153:1435-1444, 1999.
- 20 Zhong e outros, *Plant Cell*, 14:2825, 2002.

REIVINDICAÇÕES

1. Micromossomo de planta produzido por truncagem de um ou ambos os braços de um cromossomo de partida de planta, onde o micromossomo compreende um centrômero de planta nativa e é estavelmente transmitido durante mitose e meiose em uma planta compreendendo o micromossomo que é da mesma espécie da planta a partir da qual o cromossomo de partida de planta foi obtido.

2. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, em que aproximadamente 25% a aproximadamente 99,9% do cromossomo de partida de planta foi truncado.

3. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, em que o micromossomo compreende seqüências de telômero elaboradas.

4. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 3, em que as seqüências de telômero elaboradas compreendem aproximadamente 2 a 110 repetições de telômero.

5. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 3, em que as seqüências de telômero elaboradas compreendem aproximadamente 6 repetições de telômero.

6. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 3, em que as seqüências de telômero elaboradas são de *Arabidopsis*.

7. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, em que ambos os braços do cromossomo de partida de planta foram truncados.

8. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, em que o micromossomo tem tamanho de aproximadamente 1 Mb a aproximadamente 100 Mb.

9. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, em que o cromossomo de partida de planta é um cromossomo A.

10. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, em que o cromossomo de partida de planta é um cromossomo B.

11. Micromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, em que o cromossomo de partida de planta é de uma dicotiledônea.

12. Minicromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 11, em que o cromossomo de partida de planta é a de uma monocotiledônea.

5 13. Minicromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 12, em que o cromossomo de partida de planta é de milho.

14. Minicromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, adicionalmente compreendendo um sítio de recombinação específica em sítio.

10 15. Minicromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 15, em que o sítio de recombinação específica em sítio é um FRT ou sítio lox.

16. Minicromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 1, adicionalmente compreendendo um transgene.

15 17. Minicromossomo da planta, de acordo com a reivindicação 16, em que o transgene confere um traço selecionado a partir do grupo que consiste em resistência a inseto, tolerância a herbicida, metabolismo de carboidrato alterado, metabolismo de ácido graxo alterado, resistência à doenças, restauração de fertilidade macho e resistência a pesticida.

20 18. Célula de planta compreendendo o minicromossoma de planta como definido na reivindicação 1.

19. Planta compreendendo o minicromossoma de planta como definido na reivindicação 1.

20. Planta, como definido na reivindicação 18, em que a planta é milho.

25 21. Semente compreendendo o minicromossoma de planta da reivindicação 1.

22. Método de produzir um minicromossoma de planta, compreendendo as etapas de:

30 (a) transformar um cromossoma de partida de planta com um ácido nucléico heterólogo compreendendo pelo menos duas seqüências de repetição de telômeros; e

(b) permitir que a truncagem do cromossomo de partida de

planta ocorra para produzir um minicromossoma de planta.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, adicionalmente compreende transformar o cromossoma de partida de planta com um sítio de recombinação específica em sítio.

5 24. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o sítio de recombinação específica em sítio é um FRT ou sítio lox.

25. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que as seqüências de repetição de telômero são de *Arabidopsis*.

10 26. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o ácido nucléico heterólogo compreende aproximadamente 2 seqüências de repetição de telômero.

27. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o cromossomo de partida de planta é transformado por transformação mediada por *Agrobacterium*.

15 28. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o cromossomo de partida de planta é transformado por bombardeamento de DNA.

29. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que ambos os braços do cromossomo de partida de planta são truncados.

20 30. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o cromossomo de partida de planta é um cromossomo A.

31. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o cromossomo de partida de planta é um cromossomo B.

25 32. Método, de acordo com a reivindicação 22, adicionalmente compreende transformar o cromossoma de partida de planta com uma seqüência de codificação selecionada.

30 33. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que a seqüência de codificação selecionada confere um traço selecionado a partir do grupo que consiste em resistência a inseto, tolerância a herbicida, metabolismo de carboidrato alterado, metabolismo de ácido graxo alterado, resistência à doenças, restauração de fertilidade macho e resistência a pesticida.

34. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o cro-

mossomo de partida de planta está compreendido em uma célula de planta.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, em que a célula de planta compreende pelo menos 2 cópias de cromossomo B.

5 36. Método, como definido na reivindicação 18, em que o minicromossomo de planta compreende um transgene.

37. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o cromossomo A de partida de planta é transformado por transformação mediada por *Agrobacterium*.

10 38. Método, de acordo com a reivindicação 22, em que o cromossomo B de partida de planta é transformado por bombardeamento com micro-projétil.

39. Minicromossomo de planta, de acordo com a reivindicação 17, em que a seqüência de codificação conferindo restauração de fertilidade macho é um gene Rf3.

15 40. Método, de acordo com a reivindicação 33, em que a seqüência de codificação conferindo restauração de fertilidade macho é um gene Rf3.

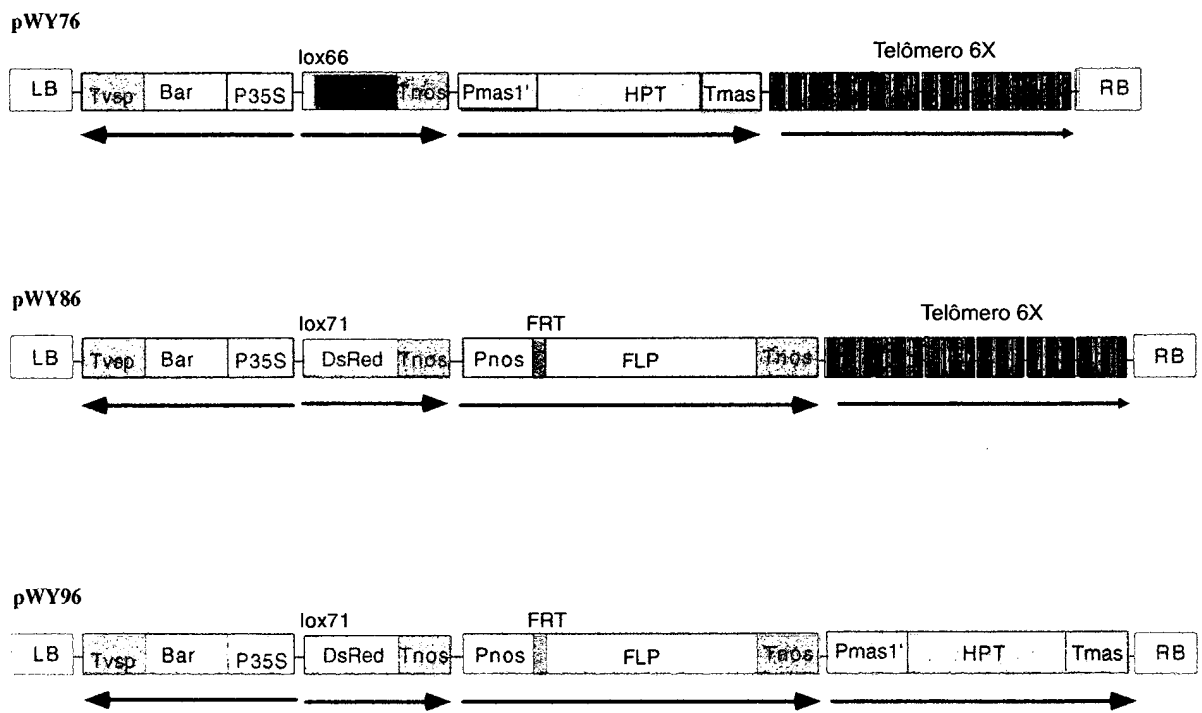


FIG. 1

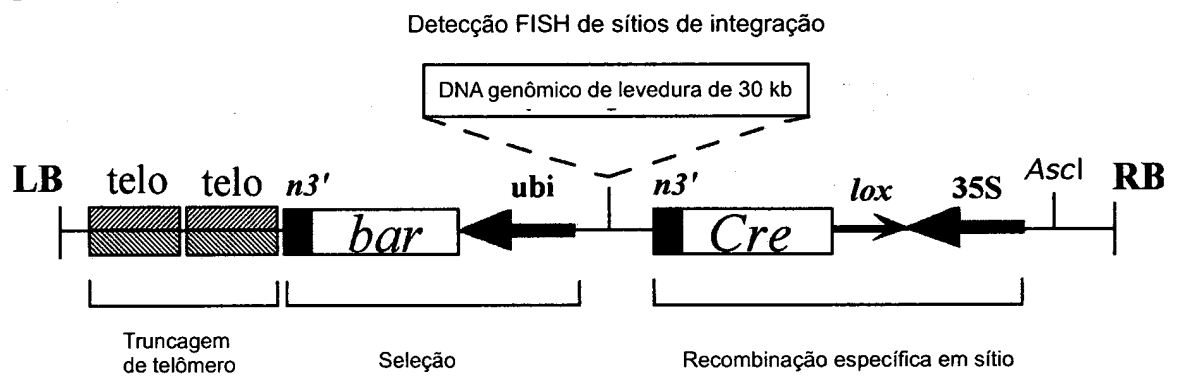
pJV21 T-DNA

FIG. 2

RESUMO

Patente de Invenção: **"PLATAFORMAS DE CROMOSSOMOS ARTIFICIAIS DE PLANTA VIA TRUNCAGEM DE TELÔMERO"**.

5 A presente invenção refere-se a minicromossomos de planta elaborados que são gerados por truncagem mediada por telômero de cromossomos nativos. Esses minicromossomos são fielmente transmitidos de uma geração à próxima e fornecem uma plataforma ideal para a criação de genes em variedades desejadas de plantas sem problemas, tal como arraste de ligação, associada com métodos de criação padrão.