



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1010858-0 B1



(22) Data do Depósito: 08/06/2010

(45) Data de Concessão: 26/01/2021

(54) Título: SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODO DE EXPRESSÃO DE UM GENE HETERÓLOGO E CASSETE DE EXPRESSÃO

(51) Int.Cl.: C07H 21/00.

(30) Prioridade Unionista: 11/06/2009 US 61/186,038.

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.

(72) Inventor(es): MICHAEL L. NUCCIO.

(86) Pedido PCT: PCT US2010037683 de 08/06/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/144385 de 16/12/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/12/2011

(57) Resumo: CASSETES DE EXPRESSÃO DERIVADOS DE MILHO. A presente invenção refere-se a cassetes de expressão que contêm sequências reguladoras derivadas de um gene de destino, por exemplo, sequências reguladoras dos genes HSP70, Ubi158 e Ubi361 para expressão de produtos de gene recombinante em plantas. Dados de definição de perfil de expressão de desenvolvimento foram usados para identificar diversos genes candidatos para o desenvolvimento de cassete de expressão constitutiva forte. Três cassetes de expressão foram desenvolvidos. Eles são baseados nos genes ZmHSP70, ZmUbi158 e ZmUBI361.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO, MÉTODO DE EXPRESSÃO DE UM GENE HETERÓLOGO E CASSETE DE EXPRESSÃO"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos EUA n.º 61/186.038, protocolado no dia 11 de junho de 2009. O pedido acima é incorporado neste por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] Esta invenção inclui cassetes de expressão que contêm sequências reguladoras derivadas de um gene de destino, por exemplo, sequências reguladoras dos genes HSP70, Ubi158 e Ubi361 para expressão de produtos de gene recombinante em plantas.

ANTECEDENTES

[003] Em biotecnologia agrícola, as plantas podem ser modificadas de acordo com as necessidades de um indivíduo. Uma maneira de realizar isto é usando modernas técnicas de engenharia genética. Por exemplo, introduzindo um gene de interesse em uma planta, a planta pode ser especificamente modificada para expressar uma característica fenotípica desejável. Para tanto, as plantas são transformadas mais comumente com um gene heterólogo abrangendo uma região promotora, uma região codificadora e uma região de terminação. Ao criar por engenharia genética um gene heterólogo para expressão em plantas, a seleção de uma promotora normalmente é um fator essencial.

[004] As promotoras são compostas por diversas regiões que são necessárias para a função da promotora. Algumas destas regiões são compostos modulares ou, em outras palavras, podem ser usadas isoladas para conceder atividade promotora ou podem ser reunidas com outros elementos para construir novas promotoras (Komarnytsky e Borisjuk, Genetic Engineering 25: 113-141(2003)).

[005] A primeira destas regiões promotoras fica imediatamente antes da sequência de codificação e forma a "região promotora central", contendo elementos de acoplamento, normalmente 20-70 pares de base

imediatamente antes do local do início da transcrição. A região promotora central normalmente contém uma caixa TATA e um elemento iniciador, bem como o local de iniciação. A extensão correta da região promotora central não é fixada, mas normalmente é bem reconhecível. Tal região existe, com alguma variação, na maioria das promotoras. As sequências de base que ficam entre os diversos elementos bem caracterizados parecem ter menos importância. A região promotora central normalmente é referida como uma região promotora mínima, pois é funcional per se para promover um nível basal de transcrição.

[006] A presença da região promotora central define uma sequência como sendo uma promotora: se não houver região, a promotora não é funcional. A região central atua para atrair o mecanismo de transcrição geral à promotora para iniciação da transcrição. Entretanto, a região promotora central não é suficiente para oferecer atividade promotora completa. Uma série de sequências reguladoras compõe o restante da promotora. As sequências reguladoras determinam o nível de expressão, o padrão espacial e temporal da expressão e, para um subconjunto de promotoras, expressão sob condições indutivas (regulação por fatores externos, como luz, temperatura, química e hormônios). As sequências reguladoras podem ser regiões curtas de 6-100 pares de base de sequência de DNA que definem os locais de ligação para fatores de transcrição (trans-acting), como fatores de transcrição. Sequências reguladoras também podem ser ativadores, regiões mais compridas de sequência de DNA que podem agir longe da região promotora central, às vezes a uma distância de diversas quilobases da região central. A atividade da sequência reguladora pode ser influenciada por fatores de transcrição, incluindo mecanismo de transcrição geral, fatores de transcrição e fatores de agrupamento de cromatina.

[007] Algumas promotoras conseguem orientar a síntese de RNA em níveis relativamente semelhantes entre todos os tecidos de uma planta. Elas são chamadas "promotoras constitutivas" ou promotoras "independentes de tecido". As promotoras constitutivas podem ser divididas entre categorias forte, moderada e fraca, de acordo com sua eficácia ao orientar a

síntese de RNA. Como é necessário em muitos casos expressar simultaneamente um gene quimérico (ou genes) em diferentes tecidos de uma planta para obter as funções desejadas do gene (ou genes), as promotoras constitutivas são especialmente úteis nesta situação. Apesar de muitas promotoras constitutivas terem sido descobertas de plantas e vírus de plantas e caracterizadas, ainda há um interesse contínuo no isolamento de mais novas promotoras constitutivas, sintéticas ou naturais, que são capazes de controlar a expressão de um gene quimérico (ou genes) a diferentes níveis de expressão e a expressão de diversos genes na mesma planta transgênica para piramidação de genes.

[008] Entre as promotoras usadas mais comumente estão a promotora de síntese de neopalina (NOS) (Ebert e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5745-5749 (1987)); a promotora de síntese de octopina (OCS); promotoras de caulimovírus, como a promotora do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 19S (Lawton e outros, *Plant Mol. Biol.* 9:315-324 (1987)), a promotora CaMV 35S (Odell e outros, *Nature* 313:810-812 (1985)), e a promotora de vírus do mosaico da escrofulária 35S (Sanger e outros, *Plant Mol. Biol.* 14, 43343 (1990)); a promotora induzida por luz da pequena subunidade de rubisco (Pellegrineschi e outros, *Biochem. Soc. Trans.* 23(2):247-250 (1995)); a promotora de Adh (Walker e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6624-66280 (1987)); a promotora de síntese de sacarose (Yang e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:414-44148 (1990)); a promotora de complexo do gene R (Chandler e outros, *Plant Cell* 1:1175-1183 (1989)); a promotora do gene de proteína de ligação à clorofila a/b; esilares.

SUMÁRIO

[009] Considerando estas necessidades, um objeto desta invenção é fornecer um ácido nucleico, preferencialmente um ácido nucleico isolado, capaz de orientar a expressão em uma célula da planta, em que a sequência de ácido nucleico abrange uma região 5'-não traduzida, um primeiro éxon, um primeiro íntron, e uma parte de um segundo éxon de um gene representado por uma sequência selecionada do grupo abrangendo SEQ ID N°: 13-33. A invenção também se relaciona à sequência de ácido nucleico

co selecionada do grupo abrangendo SEQ ID N°: 1-3. Em outro aspecto, a célula da planta abrangendo o ácido nucleico pode ser uma célula monocotiledônea ou uma célula dicotiledônea. Em ainda outro aspecto, a célula da planta abrangendo o ácido nucleico pode ser uma célula de milho ou uma célula de tabaco.

[0010] Em outro aspecto, o objeto da presente invenção é relacionar a um método de expressão de um gene heterólogo abrangendo a construção de um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3), em que o cassete de expressão seja funcional em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte; e criando uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que o gene heterólogo seja expresso. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma monocotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja milho. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma dicotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja tabaco ou soja.

[0011] Em outro aspecto, a presente invenção também se relaciona a uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3). A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo

o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma monocotiledônea. A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja milho. A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma dicotiledônea. A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja tabaco ou soja.

[0012] Em ainda outro aspecto, a presente invenção também se relaciona a um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3).

[0013] Em ainda mais outro aspecto, a presente invenção também se relaciona a uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte feita pelo método de expressão de um gene heterólogo abrangendo a construção de um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3), em que o cassete de expressão seja funcional em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte; e criando uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que o gene heterólogo seja expresso. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma monocotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja milho. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da

planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma dicotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja selecionada do grupo abrangendo tabaco e soja. Em outro aspecto, a presente invenção também se relaciona à progênie da planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte, abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3). A presente invenção também se relaciona à semente derivada da progênie da planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte. A presente invenção também se relaciona aos grãos derivados da progênie da planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte.

[0014] Em ainda outro aspecto, a presente invenção também se relaciona a uma sequência de ácido nucleico capaz de orientar a expressão em uma célula da planta, em que a sequência de ácido nucleico abranja uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo abrangendo (a) uma sequência de ácido nucleico que é pelo menos 80% idêntica a uma das IDs de SEQ N.º: 1-3; (b) uma sequência de ácido nucleico que é um fragmento funcional de uma das IDs de SEQ N.º: 1-3; e (c) uma sequência de ácido nucleico que se hibridiza sob condições rigorosas a uma das IDs de SEQ N.º: 1-3.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID N°: 1 é a sequência de nucleotídeos de prZmHSP70

SEQ ID N°: 2 é a sequência de nucleotídeos de prZmUbi158

SEQ ID N°: 3 é a sequência de nucleotídeos de prZmUbi361

SEQ ID N°: 4 é a sequência de nucleotídeos de ZmHSP70, construção binária 15907

SEQ ID N°: 5 é a sequência de nucleotídeos de ZmUbi158, construção binária 17239

SEQ ID N°: 6 é a sequência de nucleotídeos de ZmUbi361, construção binária 17282

SEQ ID Nº: 7 é a sequência de nucleotídeos da sequência ativadora de tradução líder do vírus do mosaico do tabaco

SEQ ID Nº: 8 é a sequência de nucleotídeos de uma sequência Kozak de milho aperfeiçoada

SEQ ID Nº: 9 é a sequência de nucleotídeos de uma sequência Kozak de milho aperfeiçoada

SEQ ID Nº: 10 é a sequência de nucleotídeos do cassete de expressão ZmHSP70-GUS

SEQ ID Nº: 11 é a sequência de nucleotídeos do cassete de expressão ZmUbi158-GUS

SEQ ID Nº: 12 é a sequência de nucleotídeos do cassete de expressão ZmUbi361-GUS

SEQ ID Nº: 13 é a sequência de nucleotídeos da sonda ZmUbi1 CTRL_U29159.1-3_AT

SEQ ID Nº: 14 é a sequência de nucleotídeos da sonda ZmHSP70 ZM052966_S_AT

SEQ ID Nº: 15 é a sequência de nucleotídeos da sonda ZmUbi158 CTRL_ZMU29158-3_AT

SEQ ID Nº: 16 é a sequência de nucleotídeos da sonda ZmUbi361 ZM066361_S_AT

SEQ ID Nº: 17 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso X73474 cDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 18 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso TC279798 cDNA no TIGR

SEQ ID Nº: 19 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso AX099713 gDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 20 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso CL315596.1 gDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 21 é a sequência de nucleotídeos da sequência contígua MAGI_102343 de genoma do milho

SEQ ID Nº: 22 é a sequência de nucleotídeos do gene ZmHSP70 nativo (AY222837)

SEQ ID Nº: 23 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso Q41751 cDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 24 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso AC196154 gDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 25 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso S94466 gDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 26 é a sequência de nucleotídeos da sequência contígua MAGI_6372 de genoma do milho

SEQ ID Nº: 27 é a sequência de nucleotídeos do gene ZmUbi158 nativo

SEQ ID Nº: 28 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso TC369342-cDNA de cDNA no TIGR de consenso

SEQ ID Nº: 29 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso AC196194 gDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 30 é a sequência de nucleotídeos do número de acesso U29162.1 gDNA no GenBank

SEQ ID Nº: 31 é a sequência de nucleotídeos da sequência contígua MAGI_11628 de genoma do milho

SEQ ID Nº: 32 é a sequência de nucleotídeos da sequência contígua MAGI_56231 de genoma do milho

SEQ ID Nº: 33 é a sequência de nucleotídeos do gene ZmUbi361 nativo

SEQ ID Nº: 34 é a sequência de nucleotídeos de ZmHSP70, construção de agrupamento 15902

SEQ ID Nº: 35 é a sequência de nucleotídeos de ZmUbi158, construção de agrupamento 17222

SEQ ID Nº: 36 é a sequência de nucleotídeos de ZmUbi361, construção de agrupamento 17267

SEQ ID Nº: 37 é a sequência de nucleotídeos de pCR2.1

SEQ ID Nº: 38 é a sequência de nucleotídeos de pNOV6901

SEQ ID Nº: 39 é a sequência de nucleotídeos de 1104 bp da sequência 5' não transcrita de ZmHSP70

SEQ ID Nº: 40 é a sequência de nucleotídeos da sequência líder 5' não traduzida de 304 bp de ZmHSP70

SEQ ID Nº: 41 é a sequência de nucleotídeos do íntron ZmHSP70 1602 bp

SEQ ID Nº: 42 é a sequência de nucleotídeos de uma sequência 3' não traduzida 459 bp de ZmHSP70

SEQ ID Nº: 43 é a sequência de nucleotídeos de uma sequência 3' não transcrita 535 bp de ZmHSP70

SEQ ID Nº: 44 é a sequência de nucleotídeos do terminador derivado de ZmHSP70

SEQ ID Nº: 45 é a sequência de nucleotídeos de 1506 bp da sequência 5' não transcrita de ZmUbi158

SEQ ID Nº: 46 é a sequência de nucleotídeos da sequência líder 5' não traduzida de 163 bp de ZmUbi158

SEQ ID Nº: 47 é a sequência de nucleotídeos do ativador de tradução líder do vírus ETCH do tabaco

SEQ ID Nº: 48 é a sequência de nucleotídeos do primeiro íntron ZmUbi158 2386 bp

SEQ ID Nº: 49 é a sequência de nucleotídeos de uma sequência 3' não traduzida 341 bp de ZmUbi158

SEQ ID Nº: 50 é a sequência de nucleotídeos de uma sequência 3' não transcrita 660 bp de ZmUbi158

SEQ ID Nº: 51 é a sequência de nucleotídeos de 1501 bp da sequência 5' não transcrita de ZmUbi361

SEQ ID Nº: 52 é a sequência de nucleotídeos de uma sequência líder 5' não traduzida 260 bp de ZmUbi361

SEQ ID Nº: 53 é a sequência de nucleotídeos do íntron ZmUbi361 1329 bp

SEQ ID Nº: 54 é a sequência de nucleotídeos do terminador derivado de ZmUbi361

SEQ ID Nº: 55 é a sequência de nucleotídeos do terminador derivado de ZmUbi158

SEQ ID N°: 56 é a sequência de nucleotídeos da sequência 3' não traduzida 65 bp de ZmUbi361

SEQ ID N°: 57 é a sequência de nucleotídeos de 936 bp da sequência 3' não transcrita de ZmUbi361

SEQ ID N°: 58 é a sequência de nucleotídeos de pCR4-TOPO

SEQ ID N°: 59 é a sequência de nucleotídeos do vetor 17680

SEQ ID N°: 60 é a sequência de nucleotídeos do vetor 18271

SEQ ID N°: 61 é a sequência de nucleotídeos do vetor 18272

DEFINIÇÕES

[0015] Os termos "quadro aberto de leitura" e "ORF" se referem à sequência de aminoácidos codificada entre códons de iniciação e terminação de tradução de uma sequência de codificação. Os termos "códon de iniciação" e "códon de terminação" se referem a uma unidade de três nucleotídeos adjacentes ('códon') em uma sequência de codificação que especifica a iniciação e terminação de cadeia, respectivamente, de síntese de proteína (tradução do mRNA).

[0016] O termo "estresse abiótico" se refere a fatores ambientais não vivos, como geada, seca, calor excessivo, ventos fortes, etc., que podem ter efeitos prejudiciais nas plantas.

[0017] O termo "ácido nucleico" se refere a um polinucleotídeo de alto peso molecular, que pode ser de fita simples ou de fita dupla, composto por monômeros (nucleotídeos) contendo um açúcar, fosfato e uma base que é uma purina ou pirimidina. Um "fragmento ácido nucleico" é uma fração de uma molécula de ácido nucleico específica. Em plantas mais altas, o ácido desoxirribonucleico (DNA) é o material genético, enquanto o ácido ribonucleico (RNA) está envolvido na transferência das informações contidas no DNA em proteínas. Um "genoma" é todo o corpo do material genético contido em cada célula de um organismo. O termo "sequência de nucleotídeos" se refere a um polímero de DNA ou RNA, que pode ser de fita simples ou dupla, opcionalmente contendo bases de nucleotídeo sintéticas, não naturais ou alteradas capazes de incorporação em polímeros de DNA ou RNA. Salvo indicação contrária, uma sequência de ácido nucleico específica desta

invenção também implicitamente abrange variantes modificadas conservadamente dela mesma (por exemplo, substituições de códon degenerado) e sequências complementares, bem como a sequência explicitamente indicada. Especificamente, substituições de códon degenerado podem ser alcançadas gerando sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída com resíduos deóxi-inosina e/ou de base mista (Batzer, e outros, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka, e outros, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); e Rossolini, e outros, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). O termo ácido nucleico é usado alternadamente com gene, cDNA e mRNA codificado por um gene.

[0018] O termo "unido operativamente" se refere à associação de sequências de ácido nucleico em um único fragmento de ácido nucleico de forma que a função de uma seja afetada pela outra. Por exemplo, uma promotora é unida operativamente com uma sequência de codificação ou RNA funcional quando é capaz de afetar a expressão da respectiva sequência de codificação ou RNA funcional (isto é, que a sequência de codificação ou RNA funcional esteja sob o controle transcricional da promotora). Sequências de codificação em orientação de sentido ou antissentido podem ser unidas operativamente a sequências reguladoras.

[0019] "Promotora" se refere a uma sequência de nucleotídeos que controla a expressão de uma sequência de codificação fornecendo o reconhecimento de polimerase de RNA e outros fatores exigidos para transcrição adequada. O termo "sequências reguladoras da promotora" pode abranger elementos anteriores proximais e mais distais e/ou elementos posteriores. Sequências reguladoras da promotora influenciam a transcrição, processamento ou estabilidade de RNA, ou tradução da sequência de codificação associada. Sequências reguladoras da promotora incluem ativadores, sequências líderes não traduzidas, íntrons, éxons e sequências de sinal para poliadenilação. Incluem sequências naturais e sintéticas bem como sequências que podem ser uma combinação de sequências sintéticas e naturais. Um "ativador" é uma sequência de nucleotídeos que podem estimular a atividade da promotora e pode ser um elemento congênito da promotora ou um

elemento heterólogo inserido para aumentar a especificidade de tecido ou nível de uma promotora. A sequência de codificação pode existir em uma molécula de DNA de fita simples ou dupla e pode funcionar mesmo quando colocadas antes (anterior) ou depois (posterior) da promotora. O significado do termo "promotora" inclui "sequências reguladoras da promotora".

[0020] "Transformante primária" e "geração T0" se refere a plantas transgênicas que são de mesma geração genética do tecido que foi inicialmente transformado (isto é, não tendo passado por meiose e fertilização desde a transformação). "Transformantes secundárias" e "gerações T1, T2, T3, etc." se referem a plantas transgênicas derivadas de transformantes primárias por meio de um ou mais ciclos meióticos e de fertilização. Podem ser derivadas por autofertilização de transformantes primárias ou secundárias ou cruzamentos de transformantes primárias ou secundárias com outras plantas transformadas ou não transformadas.

[0021] "Gene" se refere a um fragmento de ácido nucleico que expressa mRNA, RNA funcional ou proteína específica, incluindo sequências reguladoras. O termo "gene nativo" se refere a um gene conforme encontrado na natureza. O termo "gene quimérico" se refere a qualquer gene que contenha 1) sequências de DNA, incluindo sequências reguladoras e de codificação, que não são encontradas na natureza, ou 2) sequências codificando partes de proteínas que não se unem naturalmente, ou 3) partes de promotoras que não se unem naturalmente. Consequentemente, um gene quimérico pode abranger sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas de diferentes fontes, ou abranger sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma maneira diferente daquela encontrada na natureza. Um "transgene" se refere a um gene que foi introduzido no genoma por transformação e é mantido de maneira estável. Transgenes podem incluir, por exemplo, genes que são heterólogos ou homólogos aos genes de uma planta específica a ser transformada. Além disso, transgenes podem abranger genes nativos inseridos em um organismo não nativo, ou genes quiméricos. O termo "gene endógeno" se refere a um gene nativo em seu local natural no genoma de um

organismo. Um gene "estrangeiro" se refere a um gene que não é normalmente encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido no organismo por transferência de gene.

[0022] "Cassete de expressão" conforme usado neste instrumento, significa uma sequência de DNA capaz de orientar a expressão de uma sequência de nucleotídeos específica em uma célula hospedeira apropriada, abrangendo uma promotora unida operativamente à sequência de nucleotídeos de interesse, que é unida operativamente a sinais de terminação. Também normalmente abrange sequências exigidas para a tradução adequada da sequência de nucleotídeos. A região de codificação normalmente codifica para uma proteína de interesse, mas também pode codificar para um RNA funcional de interesse, por exemplo, RNA antissentido ou um RNA não traduzido, na direção de sentido ou antissentido. O cassete de expressão abrangendo a sequência de nucleotídeos de interesse pode ser quimérico, ou seja, pelo menos um de seus componentes é heterólogo com relação a pelo menos um de seus outros componentes.

[0023] "Íntron" se refere a uma seção interveniente de DNA que ocorre praticamente exclusivamente em um gene eucariótico, mas não é traduzida para sequências de aminoácidos no produto do gene. Os íntrons são removidos do mRNA pré-maduro por meio de um processo chamado "união", que deixa os éxons inalterados para formar um mRNA. Para os fins da presente invenção, a definição do termo "íntron" inclui modificações à sequência de nucleotídeos de um íntron derivado de um gene de destino.

[0024] "Éxon" se refere a uma seção de DNA que transporta a sequência de codificação para uma proteína ou parte dela. Os éxons são separados por sequências intervenientes sem codificação (íntrons). Para os fins da presente invenção, a definição do termo "éxon" inclui modificações à sequência de nucleotídeos de um éxon derivado de um gene de destino.

[0025] Expressão ou expressão excessiva de um gene envolve a transcrição do gene a tradução do mRNA em uma proteína madura ou precursora. "Inibição de antissentido" se refere à produção de transcrições de RNA antissentido capazes de suprimir a expressão da proteína de desti-

no. "Expressão excessiva" se refere à produção de um produto de gene em organismos transgênicos que ultrapassa os níveis de produção em organismos normais ou não transformados. "Cossupressão" se refere à produção de transcrições de RNA de sentido capazes de suprimir a expressão ou acúmulo de transcrição de genes endógenos ou estrangeiros idênticos ou consideravelmente semelhantes. O mecanismo de cossupressão pode ser em nível de DNA (como metilação de DNA), em nível transcricional, ou em nível pós-transcricional.

[0026] O termo "promotora constitutiva" se refere a uma promotora ativa em todos ou na maioria dos tecidos de uma planta em todas ou na maioria das fases de desenvolvimento. Como com as outras promotoras classificadas como constitutivas, pode haver alguma variação nos níveis absolutos de expressão entre diferentes tecidos ou fases.

[0027] Os termos "promotora constitutiva" ou promotoras "independentes de tecido" são usados alternadamente neste instrumento.

[0028] Um "fragmento de ácido nucleico isolado" se refere a um polímero de ribonucleotídeos (RNA) ou desoxirribonucleotídeos (DNA) que pode ser de fita simples ou dupla, opcionalmente contendo bases de nucleotídeo sintéticas, não naturais ou alteradas. Um fragmento de ácido nucleico isolado na forma de DNA pode abranger um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico ou DNA sintético.

[0029] Os termos "polinucleotídeo", "sequência de polinucleotídeo", "sequência de ácido nucleico", e "fragmento de ácido nucleico"/"fragmento de ácido nucleico isolado" são usados alternadamente neste instrumento. Estes termos abrangem sequências de nucleotídeos e similares. Um polinucleotídeo pode ser um polímero de DNA ou RNA que pode ser de fita simples ou dupla, opcionalmente contendo bases de nucleotídeo sintéticas, não naturais ou alteradas. Um polinucleotídeo na forma de um polímero de DNA pode abranger um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico, DNA sintético ou misturas dos mesmos. Nucleotídeos (normalmente encontrados em sua forma de 5'-monofosfato) são mencionados por uma designação de uma letra, conforme descrito a seguir: "A" para adenilato ou

deoxiadenilato (para RNA ou DNA, respectivamente), "C" para citidilato ou deoxicitidilato, "G" para guanilato ou deoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A ou G), "Y" para pirimidinas (C ou T), "K" para G ou T, "H" para A ou C ou T, "I" for inosina, e "N" para qualquer nucleotídeo.

[0030] Um "fragmento de ácido nucleico heterólogo" se refere a uma sequência que não ocorre naturalmente na sequência promotora da planta da invenção. Apesar de esta sequência de nucleotídeos ser heteróloga à sequência promotora, pode ser homóloga, nativa, heteróloga ou estranha ao hospedeiro da planta. Entretanto, é reconhecido que as promotoras presentes podem ser usadas com suas sequências de codificação nativas para aumentar ou reduzir a expressão resultante em uma alteração no fenótipo na semente transformada.

[0031] Os termos "subfragmento que é funcionalmente equivalente" e "subfragmento funcionalmente equivalente" são usados alternadamente neste instrumento. Estes termos se referem a uma parte ou subsequência de um fragmento de ácido nucleico isolado em que a capacidade de alterar a expressão do gene ou produzir um fenótipo específico é mantida, quer o fragmento ou subfragmento codifique ou não uma enzima ativa. Por exemplo, o fragmento ou subfragmento pode ser usado na concepção de genes quiméricos para produzir o fenótipo desejado em uma planta transformada. Genes quiméricos podem ser concebidos para utilização em cosupressão ou antissentido, ligando um fragmento de ácido nucleico ou subfragmento dele, codificando ou não uma enzima ativa, na direção apropriada com relação à sequência promotora de uma planta.

[0032] Os termos "consideravelmente semelhante" e "consideravelmente correspondente" conforme usados neste instrumento se referem a fragmentos de ácido nucleico em que alterações em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a capacidade do fragmento de ácido nucleico de mediar a expressão do gene ou produzir um fenótipo específico. Estes termos também se referem a modificações dos fragmentos de ácido nucleico desta invenção como exclusão ou inserção de um ou mais nucleotídeos que

não alteram consideravelmente as propriedades funcionais do fragmento de ácido nucleico resultante relativo ao fragmento inicial inalterado. Fica, portanto, entendido, como os profissionais qualificados na técnica considerarão, que a invenção abrange mais do que as sequências exemplares específicas.

[0033] As "sequências 3' sem codificação" se referem a sequências de DNA situadas a posterior de uma sequência de codificação e incluem sequências de reconhecimento de poliadenilação e outras sequências codificando sinais reguladores capazes de afetar o processamento de mRNA ou expressão de gene. O sinal de poliadenilação é normalmente caracterizado por afetar a adição de características de ácido poliadenílico na extremidade 3' do precursor mRNA. A utilização de diferentes sequências de 3' sem codificação é exemplificada por Ingelbrecht e outros, *Plant Cell* 1:671-680 (1989).

[0034] O termo "transformação" se refere à transferência de um fragmento de ácido nucleico no genoma de um organismo hospedeiro, resultando em uma herança geneticamente estável. Os organismos hospedeiros contendo os fragmentos de ácido nucleico transformados são referidos como organismos "transgênicos".

[0035] O termo "expressão transiente" se refere a expressão temporária de genes muitas vezes repórteres como β -glucuronidase (GUS), genes de proteína fluorescente GFP, ZS-YELLOW1 N1, AM-CYAN1, DS-RED em alguns tipos de célula selecionados do organismo hospedeiro onde o gene transgênico é introduzido temporariamente por um método de transformação.

[0036] Técnicas padrão de clonagem molecular e DNA recombinante usadas neste processo são bem conhecidas na técnica e são descritas com detalhes em Sambrook, J. e outros, *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (doravante "Sambrook e outros, 1989") ou Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K., Eds.; *In Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley & Sons: Nova York, 1990 (doravante "Ausubel e outros, 1990").

[0037] "PCR" ou "Reação em Cadeia da Polimerase" é uma técnica para a síntese de grandes quantidade de segmentos de DNA específicos, abrangendo uma série de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, Conn.). Normalmente, o DNA de fita dupla é aquecido desnaturado, os dois iniciadores complementares aos limites de 3' do segmento de destino são temperados a baixa temperatura e depois estendidos a uma temperatura intermediária. Um conjunto destas três etapas consecutivas compõe um ciclo.

[0038] Conforme utilizado neste instrumento, a frase "condições rigorosas de hibridização" se refere a condições sob as quais um polinucleotídeo hibridiza com sua subsequência de destino, normalmente em uma mistura complexa de ácidos nucleicos, mas essencialmente com nenhuma outra sequência. Condições rigorosas são dependentes de sequência e podem ser diferentes sob circunstâncias diferentes. Sequências mais longas normalmente hibridizam especificamente a temperaturas mais altas. Um guia abrangente sobre a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen, 1993. Geralmente, condições rigorosas são selecionada como aproximadamente 5-10°C a menos do que o ponto de fusão térmico (T_m) da sequência específica a uma força iônica e pH definidos. O T_m é a temperatura (sob força iônica, pH, concentração de ácido nucleico definidos) na qual 50% das sondas adicionais ao destino hibridizam até a sequência de destino com equilíbrio (como as sequências de destino existem em excesso, ao T_m , 50% das sondas são ocupadas com equilíbrio). Uma hibridização rigorosa exemplar é realizada a uma temperatura de 65°C, preferivelmente 60°C e mais preferivelmente 55°C, em solução salina tamponada com citrato de força dupla (2X) (SSC) contendo 0,1 % SDS seguida por enxágue do apoio à mesma temperatura, mas com um tamponamento com uma concentração reduzida de SSC. Tais tamponamentos de concentração reduzida são normalmente um décimo da força SSC (0,1 X SSC) contendo 0,1 % SDS, preferivelmente 0,2X SSC contendo 0,1 % SSC e mais preferivelmente meia força SSC (0,5X SSC) contendo 0,1 % SDS.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0039] As sequência de nucleotídeos da promotora e métodos descritos neste instrumento são úteis para regular a expressão de qualquer sequência de ácido nucleico heterólogo em uma planta hospedeira de forma a alterar o fenótipo de uma planta.

[0040] Diversas alterações no fenótipo são de interesse, incluindo, entre outros, modificar a composição de ácidos graxos em uma planta, alterar a composição de aminoácidos de uma planta, alterar o sistema de defesa de patógenos de uma planta, alterar a resposta da planta ao ambiente, e similares. Estes resultados podem ser alcançados oferecendo expressão de produtos heterólogos ou maior expressão de produtos endógenos nas plantas. Alternativamente, os resultados podem ser alcançados oferecendo uma redução da expressão de um ou mais produtos endógenos, particularmente enzimas ou cofatores na planta. Estas alterações resultam em uma alteração no fenótipo da planta transformada.

[0041] Os genes de interesse refletem os mercados comerciais e interesses dos envolvidos no desenvolvimento dos cultivos. Os cultivos e mercados de interesse mudam e, conforme as nações em desenvolvimento abrem mercados mundiais, também surgirão novos cultivos e tecnologias. Além disso, de acordo com o nosso entendimento das características agrônômicas, como aumento de heterose e rendimento, a escolha dos genes para transformação mudará de maneira correspondente. Categorias de transgenes, também conhecidos como genes heterólogos, por exemplo, incluem, entre outras, genes codificando importantes características agrônômicas, resistência a insetos, resistência a doenças, resistência a herbicidas, esterilidade, características de grãos ou semente, e produtos comerciais. Genes de interesse incluem, geralmente, os envolvidos em metabolismo de nutriente, carboidrato, amido ou óleo bem como os que afetam tamanho da semente, desenvolvimento da planta, regulação do crescimento da planta e melhoria de rendimento. Regulação de crescimento e desenvolvimento da planta também se refere à regulação de desenvolvimento e crescimento de diversas partes de uma planta, como flor, semente, raiz, folha e germe.

[0042] Outras características comercialmente desejáveis são

genes e proteínas que oferecem resistência ao frio, calor, sais e seca.

[0043] Genes com resistência a doenças e/ou insetos podem codificar resistência a pragas que apresentem grande obstáculos ao rendimento, como, por exemplo, antracnose, vírus do mosaico da soja, nematoide de cisto de soja, nematoide de raiz, melanose marrom, míldio do tabaco, mancha púrpura da semente, desintegração da semente e doenças de mudas normalmente causadas pelos fungos *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Diaporthe* sp. Ressecamento bacteriano causado pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*. Genes que conferem resistência a insetos incluem, por exemplo, genes da proteína tóxica *Bacillus thuringiensis* (Patente dos EUA N.º 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser et al (1986) Gene 48:109); lecitinas (Van Damme e outros (1994) Plant Mol. Biol. 24:825); e similares.

[0044] Características de resistência a herbicida podem incluir codificação de genes para resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de síntese de acetolactato (ALS), especificamente os herbicidas do tipo sulfonilureia (por exemplo, o gene de ALS de síntese de acetolactato contendo mutações que causam este tipo de resistência, especificamente as mutações S4 e/ou HRA). Os mutantes do ALS-gene codificaram resistência ao clorsulfurão herbicida. Transferase de acetil glifosato (GAT) é uma N-acetiltransferase do *Bacillus licheniformis* que foi aperfeiçoada por mistura de gene para acetilação do herbicida de amplo espectro, glifosato, formando a base de um novo mecanismo de tolerância ao glifosato em plantas transgênicas (Castle e outros (2004) Science 304, 1151-1154). Seria óbvio usar outras características de resistência a herbicida para um profissional qualificado na técnica.

[0045] As sequências da promotora, preferivelmente sequências de promotora isoladas, da presente invenção podem ser modificadas para fornecer uma série de níveis de expressão constitutiva da sequência de nucleotídeos heterólogos. Desse modo, menos do que todas as regiões promotoras podem ser utilizadas e a capacidade de orientar a expressão da sequência de codificação é retida. Entretanto, é reconhecido que os níveis

de expressão de mRNA podem ser reduzidos com exclusões de partes de sequências da promotora. Em alguns casos, a expressão reduzida pode ser desejável. A modificação das sequências da promotora pode mudar a natureza constitutiva independentemente de tecido da expressão. Portanto, fragmentos de SEQ ID N°: 1-3 que são 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticos a SEQ ID N°: 1-3 ainda podem funcionar conforme exemplificado por esta descrição.

[0046] Para identificar genes de milho candidatos e respectivas sequências reguladoras apropriadas para desenvolvimento de cassete de expressão, dados de definição de perfil de expressão de milho de uma série de definições de perfil de expressão de desenvolvimento foram analisados por sondas que demonstraram o sinal médio mais alto entre todas as amostras. O sinal médio foi calculado com relação a cada sonda e depois cada sonda foi classificada com base no sinal médio. A sonda CTRL_U29159.1-3_AT (SEQ ID N°: 13) representando ZmUbi1, um cassete de expressão constitutivo bem caracterizado, ficou em 7º nesta análise. Esta análise foi a base para selecionar 3 promotoras candidatas adicionais para construção de cassete de expressão constitutivo: ZmHSP70, ficou em 2º (SEQ ID N°: 23), ZmUbi158, ficou em 3º (SEQ ID N°: 30), e ZmUbi361, ficou em 10º (SEQ ID N°: 38). Os dados na tabela 1 (10 principais constitutivos) resumem os resultados.

Tabela 1. Força de sinal relativa da expressão em tecidos

Origem do tecido	Conjunto de sonda				
	CTRL_ZMU29				
	ZM052966_S_AT		158-3_ATZM053951_S		ZM061586_S
	ZMGLYR_AT	(ZmHSP70)	(ZmUbi158)	_AT	_AT
raiz seminal e radical	10907,15	9217,56	9572,11	10412,69	10060,77
raízes adultas	10903,13	10001,66	9965,31	8997,16	10155,24
raízes nodais	11760,50	9542,12	10056,97	10329,44	9358,79
folha juvenil	9518,35	7137,70	6566,96	8350,58	9641,96
folha envelhecida	10018,55	7497,50	7710,78	5641,76	6446,74
seiva V8	9326,25	8031,77	9436,65	9599,32	8547,60
seiva V16	14594,27	13693,39	12272,07	11219,01	7632,49
Espiga em desenvolvimento 3 cm	8177,18	9015,15	7803,35	8266,07	7067,92
Espiga em desenvolvimento 7 cm	607,48	76,06	484,12	1281,35	73,59
núcleo inteiro 6 dias	11679,11	9566,74	8771,16	9721,33	7104,92
núcleo inteiro 14 dias	13389,77	8975,52	9415,35	9525,77	9661,14
embrião 21 DAP	10643,19	8800,73	8430,46	9243,28	8011,14
embrião 38 DAP	12015,99	12339,52	11046,12	9159,61	9159,66
semente de germe, 4 dias, raiz	10066,62	8472,70	7819,38	8064,94	9221,40
semente de germe, 4 dias, folha	9941,40	8751,84	8256,62	7591,37	9020,52
pendão V9	8259,98	8274,28	7500,03	7842,82	7005,32

Tabela 1- Continuação...

Origem do tecido	Conjunto de sonda				
	CTRL_ZMU29				
	ZM052966_S_AT		158-3_ATZM053951_S		ZM061586_S
	ZMGLYR_AT	(ZmHSP70)	(ZmUbi158)	_AT	_AT
pendão V12	10924,53	10288,79	9028,84	10011,80	9066,98
pendão V15	9274,22	6979,61	7846,33	9202,04	9211,33
pólen	9126,88	286,29	7254,20	16575,82	19141,66
caule V8	10058,22	8371,50	9367,13	9473,01	9188,67
cabelo em resguardo de pólen	10802,07	10034,99	9891,29	9913,21	9687,58
cabelo, 6 horas, pós-pólen	9792,35	8673,96	8430,56	8422,46	7907,84
endosperma 18 DAP	13397,68	13009,87	11099,11	9561,22	9093,59
endosperma 34 DAP	9289,95	6636,56	6922,05	6703,88	5729,43
RNA total de óvulo	10111,60	10188,94	10644,03	6577,37	10832,81
RNA total de gluma	14327,61	12774,00	12605,20	7790,93	13960,66
sabugo-seiva	6503,41	6185,30	5753,57	5856,25	4865,52
óvulos	12820,39	13769,27	12621,25	10368,72	12429,59
pistilos, 1 DAP	12267,82	13199,19	11425,03	11407,76	6356,14
pistilos, 3 DAP	12158,15	11033,95	12346,68	11409,95	9136,00
pistilos, 7 DAP	13391,55	13597,54	12418,38	12070,45	8879,08
Força do sinal, média	10517,91	9174,97	9121,33	9051,33	8827,62
Desvio padrão	2624,81	3241,63	2488,37	2525,97	3067,59

Tabela 1 - continuação.

Conjunto de sonda

	ZM066361_S				
	CTRL_U29159.1-				
		3_AT	ZM066306_S	ZM005767_S	_AT
<u>Origem do tecido</u>	ZM052966_X_AT	(ZmUbi1)	_AT	_AT	(ZmUbi361)
raiz seminal e radical	9315,47	8555,27	7750,42	7708,88	10177,94
raízes adultas	10120,03	10505,06	7667,23	7603,02	9921,92
raízes nodais	9811,43	9492,46	8537,38	8394,66	9218,59
folha juvenil	7553,12	5037,83	6077,48	5717,33	7487,63
folha envelhecida	7476,21	7450,23	2994,93	3008,72	7478,51
seiva V8	8188,00	7363,40	8248,54	7856,22	6788,14
seiva V16	13763,43	10582,39	9896,16	9923,44	10345,79
Espiga em desenvolvimento 3 cm	8648,09	6579,52	7773,56	7491,95	5926,66
Espiga em desenvolvimento 7 cm	139,70	499,13	266,03	284,39	274,11
núcleo inteiro 6 dias	9557,31	7663,38	7717,82	7817,33	6916,97
núcleo inteiro 14 dias	10472,04	7713,56	6221,95	6521,93	6013,73
embrião 21 DAP	8504,44	6908,90	7796,26	7716,60	5819,63
embrião 38 DAP	11808,95	11447,82	10177,94	10256,65	7254,75
semente de germe, 4 dias, raiz	8764,92	8639,81	7071,09	6630,08	8194,64
semente de germe, 4 dias, folha	8605,23	8672,62	7518,66	7417,38	7752,10

Tabela 1 - continuação.

Conjunto de sonda

	ZM066361_S				
	CTRL_U29159.1-				
		3_AT	ZM066306_S	ZM005767_S	_AT
<u>Origem do tecido</u>	ZM052966_X_AT	(ZmUbi1)	_AT	_AT	(ZmUbi361)
pendão V9	8075,52	6121,51	7230,14	6797,39	5537,46
pendão V12	10310,96	8362,43	8872,89	8897,63	6978,87
pendão V15	7668,53	8887,16	6383,93	6229,51	5742,48
pólen	363,79	16480,52	14143,54	14079,72	2659,64
caule V8	8453,50	7235,99	7894,02	7741,64	7045,43
cabelo em resguardo de pólen	10364,53	6942,36	9752,02	9148,55	5780,80
cabelo, 6 horas, pós-pólen	8835,64	6528,25	7701,26	7650,39	5166,31
endosperma 18 DAP	12071,60	10813,15	6930,90	7304,75	6665,10
endosperma 34 DAP	6919,00	6949,99	5635,90	5413,97	5380,62
RNA total de óvulo	10261,25	10209,65	8538,09	8176,83	8143,43
RNA total de gluma	12928,76	12904,97	12578,31	11797,52	9104,01
sabugo-seiva	6079,49	4732,42	5511,93	5428,60	4140,28
óvulos	9307,86	12515,98	13615,20	13090,07	10874,61
pistilos, 1 DAP	9085,17	10524,48	11647,45	11314,44	8973,97
pistilos, 3 DAP	6732,52	10897,63	11477,10	11233,68	9293,46

Tabela 1 - continuação.

Conjunto de sonda

	ZM066361_S				
	CTRL_U29159.1-				
		3_AT	ZM066306_S	ZM005767_S	_AT
<u>Origem do tecido</u>	ZM052966_X_AT	(ZmUbi1)	_AT	_AT	(ZmUbi361)
pistilos, 7 DAP	9649,21	11810,20	13129,90	12775,99	9691,12
Força do sinal, média	8704,38	8678,32	8282,52	8110,62	7120,93
Desvio padrão	2843,85	2953,33	2953,36	2860,73	2317,33

[0047] Vetores de plasmídeos abrangendo os cassetes de expressão recombinante da presente invenção podem ser construídos. A escolha do vetor de plasmídeo depende do método que será usado para transformar as células hospedeiras. O técnico versado sabe quais são os elementos genéticos que devem existir no vetor de plasmídeo para transformar, selecionar e propagar com sucesso células hospedeiras contendo o gene químico.

[0048] Métodos para transformação de monocotiledôneas, principalmente usando *Agrobacterium tumefaciens*, e obtendo plantas transgênicas foram publicados para monocotiledôneas (Patente dos EUA N.º 6.037.522), trigo (Cheng e outros, Plant Cell Rep. 15:971-980 (1997), e especificamente milho (Patente dos EUA N.º 6.051.409). Métodos para transformação de dicotiledôneas, principalmente usando *Agrobacterium tumefaciens*, e obtendo plantas transgênicas foram publicados, entre outros, para algodão (Patente dos EUA N.º 5.004.863, Patente dos EUA N.º 5.159.135); soja (Patente dos EUA N.º 5.569.834, Patente dos EUA N.º 5.416.011); Brássica (Patente dos EUA N.º 5.463.174); e amendoim (Cheng e outros, Plant Cell Rep. 15:653-657 (1996), McKently e outros, Plant Cell Rep. 14:699-703 (1995)). Para ver uma análise de outros métodos normalmente usados para transformação de plantas, consulte Newell, C. A., Mol. Biotechnol. 16:53-65 (2000).

[0049] Existem vários métodos para a regeneração de plantas a partir de tecidos de plantas. O método específico de regeneração dependerá do tecido inicial da planta e da espécie específica da planta a ser regenerada. A regeneração, desenvolvimento e cultivo de plantas de transformantes protoplastas de planta simples ou de diversos explantes transformados são bem conhecidos na técnica (Weissbach e Weissbach, Eds.; In Methods for Plant Molecular Biology; Academic Press, Inc.: San Diego, Calif., 1988). Este processo de regeneração e crescimento normalmente inclui as etapas de seleção de células transformadas, fazendo a cultura destas células individualizadas por meio das fases habituais de desenvolvimento embrionário ou por meio de fase de plantinha enraizada. Embriões e sementes

transgênicos são regenerados de modo semelhante. Os germes enraizados transgênicos resultantes são depois plantados em um meio de crescimento de planta apropriado, como solo. Preferivelmente, as plantas regeneradas são autopolinizadas para fornecer plantas transgênicas homozigotas. De outra forma, o pólen obtido das plantas regeneradas é cruzado com plantas crescidas a partir de sementes de linhas agronomicamente importantes. Inversamente, o pólen das plantas destas linhas importantes é usado para polinizar plantas regeneradas. Uma planta transgênica da presente invenção contendo um polipeptídeo desejado é cultivada usando métodos bem conhecidos pelos versados da técnica.

[0050] Além dos procedimentos discutidos acima, os profissionais conhecem os materiais de recurso padrão que descrevem as condições e procedimentos específicos para a construção, manuseio e isolamento de macromoléculas (por exemplo, moléculas de DNA, plasmídeos, etc.), geração de fragmentos de DNA recombinante e construções de expressão recombinantes e a triagem e isolamento de clones (consulte, por exemplo, Sambrook, J. e outros, In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Maliga e outros, In *Methods in Plant Molecular Biology*; Cold Spring Harbor Press, 1995; Birren e outros, In *Genome Analysis: Detecting Genes*, 1; Cold Spring Harbor: Nova York, 1998; Birren e outros, In *Genome Analysis: Analyzing DNA*, 2; Cold Spring Harbor: Nova York, 1998; Clark, Ed., In *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*; Springer: Nova York, 1997).

[0051] O profissional versado também reconhecerá que diferentes eventos de transformação independentes resultarão em diferentes níveis e padrões de expressão dos genes quiméricos (Jones e outros, *EMBO J.* 4:2411-2418 (1985); De Almeida e outros, *Mol. Gen. Genetics* 218:78-86 (1989)). Assim, diversos eventos devem ser triados para obter linhas exibindo o nível e padrão de expressão desejado. Tal triagem pode ser realizada por análise Northern de expressão de mRNA, análise Western de expressão de proteína ou análise fenotípica. Também de interesse são as sementes obtidas de plantas transformadas exibindo o perfil de expressão do gene

desejado.

[0052] Transformação e seleção podem ser realizadas usando métodos bem conhecidos aos profissionais da técnica incluindo, entre outros, os métodos descritos neste instrumento.

EXEMPLOS

Exemplo 1: ZmHSP70

[0053] A sonda ZmHSP70 GeneChip, ZM052966_S_AT (SEQ ID N°: 14), foi usada para identificar cDNAs e gDNAs correspondentes em bancos de dados genômicos. Os cDNAs identificados incluem acesso X73474 do GenBank (SEQ ID N°: 17) e acesso TC279798 do TIGR (SEQ ID N°: 18).

[0054] Os gDNAs incluem acessos AX099713 (SEQ ID N°: 19) e CL315596.1 do GenBank (SEQ ID N°: 20), e sequência contígua MAGI_102343 de genoma do milho (SEQ ID N°: 21). Estas sequências foram usadas para desenvolver uma anotação em nível de base do gene ZmHSP70 (SEQ ID N°: 22). O gene ZmHSP70 abrange dois éxons separados por um íntron. Os dados da sequência foram usados para projetar um cassete de expressão seguindo o método usado para fazer os cassetes de expressão OsMADS, conforme descrito no Pedido de Patente dos EUA, Publicação Número 2007/0006344, incorporado nesse instrumento por referência em sua totalidade. Antes do gene de interesse (GOI) o cassete de expressão concluído abrange a promotora ZmHSP70 contendo 1104 bp da sequência 5' não transcrita (SEQ ID N°: 39), uma sequência líder 5' não traduzida 304 bp (SEQ ID N°: 40) que termina em uma sequência Kozak de milho aperfeiçoada (gtaaaccatgg, SEQ ID N°: 9) e o íntron 1602 bp ZmHSP70 (SEQ ID N°: 51).

[0055] A sequência de codificação da proteína ZmHSP70 foi silenciada realizando mutação dos códons de início de tradução e alterando outros códons para inserir paradas de tradução antes do local do códon de início de tradução projetado (no *NcoI*). A posterior da GOI, o cassete de expressão abrange uma sequência de terminador (SEQ ID N°: 44) derivado do gene ZmHSP70. Abrange uma sequência 459 bp 3' não traduzida (SEQ ID

Nº: 42) que inicia logo depois do códon de parada de tradução, mais 535 bp de sequência ZmHSP70 3' não transcrita (SEQ ID Nº: 43). SEQ ID Nº: 34 e 4 definem os vetores binários e de agrupamento de ZmHSP70, respectivamente. Em ambos os casos, o cassete de expressão ZmHSP70 (SEQ ID Nº: 10) abrange o gene repórter β -glucuronidase (GUS).

[0056] O vetor de agrupamento ZmHSP70 (SEQ ID Nº: 34) foi criado pelo seguinte método: O término HSP70 (SEQ ID Nº: 44) teve PCR ampliado do DNA genômico de milho e clonado em pNOV6901 como um fragmento *SacII/XmaI*. O método QUIKCHANGE® (Stratagene) foi usado para corrigir a disparidade de uma base. A promotora HSP70 (prZmHSP70) teve PCR ampliado de DNA genômico de milho, que foi subsequentemente clonado por TOPO® (Invitrogen) em pCR2.1 (SEQ ID Nº: 37). Mutagênese orientada por local mediada por QUICKCHANGE® adicional excluiu os locais de códon de início (ATG) na região 5'-UTR, inativou dois locais *SacI*, e corrigiu a discrepância de uma base no íntron. O prZmHSP70 modificado foi clonado em GUSTmHSP70 recombinante (pNOV6901, SEQ ID Nº: 38) como um fragmento *XhoI/NcoI*.

[0057] O vetor binário ZmHSP70 (SEQ ID Nº: 4) foi criado pelo seguinte método. O vetor receptor foi linearizado com a enzima de restrição *RsrII*. O vetor de agrupamento ZmHSP70 foi digerido com enzimas de restrição *RsrII* e *SanDI*, extirpando o cassete de expressão conforme definido pela SEQ ID Nº: 10. O cassete de expressão foi então clonado no vetor receptor no local *RsrII*.

[0058] O vetor binário ZmHSP70 (SEQ ID Nº: 4) foi transformado em milho por transformação por *Agrobacterium*, uma técnica bem conhecida aos profissionais qualificados. Dos 46 eventos que foram produzidos, 17 deram semente. A enzima GUS em folhas totalmente expandidas foi testada por localização histoquímica (todos os eventos) e atividade da enzima (eventos selecionados).

[0059] Perfurações em folha de dezessete plantas de milho T0 foram amostradas em termos de análise histoquímica de atividade GUS orientada pelo cassete de expressão ZmHSP70, quinze plantas mostraram ex-

pressão GUS positiva e todas as expressões positivas demonstraram intensidade de descoloração leve. Para conformar a expressão GUS orientada por prZmHSP70, realizamos análise de atividade GUS pelo método de ensaio 4-metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo (MUG) (Armenta, e outros) de diversas amostras de plantas. Análise histoquímica é uma medida puramente qualitativa neste caso. O ensaio de atividade da enzima GUS fornece informações quantitativas por meio de extração e análise da proteína produzida pelo transgene. O GUS orientado por prZmHSP70 possui forte expressão e uma estrutura de superfície de folha como "papila foliácea" ou "pelos glandulares" ou "tricomos" (protrusões da superfície epidérmica).

[0060] Os eventos MZAS2007020377A005A e MZAS2007020377A010A são de cópia simples, positivo para GUS e produzem muita semente. Foram selecionados para análise T1. A segregação foi consistente com os dados T0. A Tabela 2 resume a análise de mudas F1. Três ensaios foram realizados para examinar atividade de gene repórter GUS no tecido de folha jovem de cada planta: localização histoquímica, ELISA e atividade de enzima. Com base nestes resultados, as plantas foram selecionadas para avaliação de desenvolvimento da expressão GUS.

Tabela 2. Resumo de caracterização da planta prZmHSP70

ID da planta	GUS	MUG,
	ELISA ¹	Atividade ²
{AX5707/MZAS2007020377A005A}2	124	548
{AX5707/MZAS2007020377A005A}3	129	752
{AX5707/MZAS2007020377A005A}8	132	552
{AX5707/MZAS2007020377A005A}10	128	675
{AX5707/MZAS2007020377A005A}12	116	730
{AX5707/MZAS2007020377A005A}16	180	1010
{AX5707/MZAS2007020377A005A}18	207	1167
{AX5707/MZAS2007020377A005A}19	114	644
{AX5707/MZAS2007020377A005A}24	206	1325
{AX5707/MZAS2007020377A010A}1	550	4800
{AX5707/MZAS2007020377A010A}5	608	4892
{AX5707/MZAS2007020377A010A}6	739	7713
{AX5707/MZAS2007020377A010A}13	609	4947

ID da planta	GUS ELISA ¹	MUG, Atividade ²
{AX5707/MZAS2007020377A010A}16	529	5515
{AX5707/MZAS2007020377A010A}17	532	4922
{AX5707/MZAS2007020377A010A}20	723	6124
{AX5707/MZAS2007020377A010A}21	531	5313

¹ ng/mg proteína solúvel

² pmol/min/mg proteína

[0061] Um experimento adicional com mudas MZAS2007020377A005A examinou a atividade GUS em resposta a ensaio de choque térmico. Plantas de duas semanas passaram por choque térmico a 42°C por 2 horas, depois a atividade GUS foi testada por ELISA e ensaio de enzima. Os resultados estão na Tabela 3. Não houve diferença discernível na atividade GUS entre as plantas de controle e as que passaram por choque térmico.

Tabela 3. Atividade GUS em resposta a choque térmico.

Informação				
	ID da planta	do evento	GUS ELISA	MUG, Atividade
Controle	15907-1	005A	804	9826
	15907-6	005A	733	8892
	15907-8	005A	717	9821
	15907-12	005A	759	9897
	15907-14	005A	761	10593
	15907-16	005A	693	7502
	15907-17	005A	664	9688
	15907-19	005A	592	8318
	15907-20	005A	668	7983
	15907-22	005A	652	7822
	15907-24	005A	759	10502
	15907-45	010A	585	8380
	15907-46	010A	790	8560
	Média		706	9060

Continuação...

Choque térmico	15907-27	005A	680	8821
	15907-28	005A	573	7936
	15907-29	005A	625	9290
	15907-30	005A	745	9307
	15907-32	005A	455	8152
	15907-34	005A	574	8485
	15907-35	005A	597	7668
	15907-36	005A	676	7645
	15907-38	005A	601	11052
	15907-40	005A	538	9217
	15907-42	005A	464	9776
	15907-47	010A	648	9960
	15907-48	010A	774	11836
Média			612	9165

¹ ng/mg proteína total² pmol/min/mg proteína

[0062] A Tabela 4 fornece dados que resumem os dados de localização histoquímica sobre tecido reprodutivo de planta ZmHSP70 T1/B1.

Tabela 4. Resultados de localização histoquímica T1/B1 para eventos 15907.

ID da planta	Tempo da amostra	Cabelo	Núcleo	Bainha da espiga	Seiva da espiga	Caule da espiga	Pendão
MZAS2007020377A005A-24a	dia de polinização	0	3	2	4	4	ND
MZAS2007020377A005A-10	dia de polinização	0	3	2	4	4	0
MZAS2007020377A005A-2	dia de polinização	0	3	2	4	4	0
MZAS2007020377A005A-3	6 dias pós-polinização	0	3*	2	3	ND	ND
MZAS2007020377A005A-24b	6 dias pós-polinização	0	3	2	4	4	ND
MZAS2007020377A005A-16	10 dias pós-polinização	0	3*	2	3	ND	ND
MZAS2007020377A005A-18	10 dias pós-polinização	0	3*	2	3	ND	ND
MZAS2007020377A010A-16	5 dias antes da polinização	ND	ND	3	4	3	2
MZAS2007020377A010A-21	5 dias antes da polinização	ND	ND	ND	4	3	0
MZAS2007020377A010A-5	dia de polinização	0	2	2	3	3	0
MZAS2007020377A010A-20	6 dias pós-polinização	0	3*	2	4	ND	ND
MZAS2007020377A010A-6	6 dias pós-polinização	0	2*	2	3	4	ND
MZAS2007020377A010A-17	10 dias pós-polinização	ND	3*	2	3	ND	ND

Legenda

- 0 negativo
- 1 azul muito claro
- 2 azul claro
- 3 azul
- 4 azul escuro
- 5 azul muito escuro
- ND sem dados

*endosperma e embrião são negativos

[0063] Os dados indicados aqui demonstram que prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1) é funcional na maioria dos tecidos de planta de milho.

Exemplo 2: ZmUbi158

[0064] A sonda ZmUbi158 GeneChip, CTRL_ZMU29158-3_AT (SEQ ID N°: 15), foi usada para identificar cDNAs e gDNAs correspondentes em bancos de dados genômicos. Os cDNAs identificados incluem acesso Q41751 do GenBank (SEQ ID N°: 23). Os gDNAs incluem acessos AC196154 (SEQ ID N°: 24) e S94466 do GenBank (SEQ ID N°: 25), e sequência contígua MAGI_6372 de genoma do milho (SEQ ID N°: 26).

Estas sequências foram usadas para desenvolver uma anotação em nível de base do gene ZmUbi158 (SEQ ID N°: 27). O gene ZmUbi158 abrange três éxons separados por dois íntrons. Os dados da sequência foram usados para projetar um cassete de expressão seguindo o método usado para fazer os cassetes de expressão OsMADS, conforme descrito no Pedido de Patente dos EUA, Publicação N.º 2007/0006344, incorporado neste instrumento por referência em sua totalidade. Antes do gene de interesse (GOI) o cassete de expressão concluído abrange a promotora ZmUbi158 contendo 1506 bp da sequência 5' não transcrita (SEQ ID N°: 45), uma sequência líder 5' não traduzida 163 bp (SEQ ID N°: 46) que contém o ativador de tradução líder do vírus ETCH do tabaco (SEQ ID N°: 47) e termina em uma sequência Kozak de milho aperfeiçoada (ataaaccatgg) (SEQ ID N°: 8) e o primeiro íntron 2386 bp ZmUbi158 (SEQ ID N°: 48).

[0065] A sequência de codificação da proteína ZmUbi158 foi silenciada realizando mutação dos códons de início de tradução e alterando outros códons para inserir paradas de tradução antes do local do códon de início de tradução projetado (no *NcoI*). A posterior da GOI, o cassete de expressão abrange uma sequência de terminador (SEQ ID N°: 55) derivado do gene ZmUbi158. Abrange uma sequência 341 bp 3' não traduzida (SEQ ID N°: 49) que inicia logo depois do códon de parada de tradução, mais 660 bp de sequência ZmUbi158 3' não transcrita (SEQ ID N°: 50). SEQ ID N°: 35 e 5 definem os vetores binários e de agrupamento de ZmUbi158, respectivamente. Em ambos os casos, o cassete de expressão ZmUbi158 (SEQ ID

Nº: 11) abrange o gene repórter β -glucuronidase (GUS).

[0066] A promotora prZmUbi158 (SEQ ID Nº: 2) foi projetada conforme descrito acima. O produto foi verificado por análise de restrição e análise de sequência completa. O componente da sequência de codificação GUS foi clonado no cassete de expressão como um fragmento *NcoI/SacI*. As ligações de clonagem foram sequenciadas.

[0067] O cassete de expressão ZmUbi158-GUS (SEQ ID Nº: 11) foi extirpado de 17222 como um fragmento *RsrII/SanDI* e ligado ao local *RsrII* no vetor receptor. As ligações de clonagem foram sequenciadas.

[0068] O vetor binário ZmUbi158 (SEQ ID Nº: 5) foi transformado em milho por transformação por *Agrobacterium*, uma técnica bem conhecida. Dos 35 eventos que foram produzidos, 14 deram semente. A Tabela 5 resume os dados de produção de semente destes eventos. A enzima GUS em folhas jovens e totalmente expandidas foi testada por localização histoquímica e ELISA. Os dados T0 estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados do ensaio GUS de plantas T0.

ID planta T0	ELISA ¹	ELISA ²	Ensaio histoquímico
			GUS ³
MZDT080326A001A	17652	39984	positivo
MZDT080326A002A	14592	26280	positivo
MZDT080326A003A	476	1141	negativo
MZDT080326A005A	21508	34883	positivo
MZDT080326A008A	6212	28546	positivo
MZDT080326A009A	34962	69172	positivo
MZDT080326A014A	34337	56401	positivo
MZDT080326A024A	33900	54698	positivo
MZDT080326A025A	81941	36831	positivo
MZDT080326A026A	2678	8222	positivo
MZDT080326A031A	16524	30427	positivo
MZDT080326A032A	29	ND	negativo
MZDT080326A033A	27084	58994	positivo
MZDT080326A042A	5127	19399	positivo

ID planta T0	ELISA ¹	ELISA ²	Ensaio histoquímico
			GUS ³
MZDT080326A043A	38	ND	negativo
MZDT080326A046A	11576	22534	positivo
MZDT080326A047A	8478	45792	positivo
MZDT080326A052A	14020	45121	positivo
MZDT080326A053A	12904	41312	positivo
MZDT080326A061A	2474	5904	positivo
MZDT080326A064A	7407	39874	positivo
MZDT080326A068A	9349	18439	positivo
MZDT080326A072A	7937	40374	positivo
MZDT080326A076A	8571	24114	positivo
MZDT080326A079A	9520	ND	ND
MZDT080326A080A	14627	25151	positivo
MZDT080326A082A	11389	41792	positivo
MZDT080326A088A	13597	56406	positivo
MZDT080326A089A	11499	33423	positivo
MZDT080326A094A	10392	46578	positivo
MZDT080326A099A	6037	30037	positivo
MZDT080326A101A	7296	46100	positivo
MZDT080326A103A	4115	39834	positivo
MZDT080326A104A	6241	22930	positivo

¹ GUS como ng/mg de proteína solúvel de tecido de folha V6.

² GUS como ng/mg de proteína solúvel de tecido de folha V6.

³ tecido de folha foi incubado em reagente de coloração histoquímica durante a noite a 37°C, depois foi limpo e marcado como positivo ou negativo.

[0069] A Tabela 6 resume os dados do ensaio GUS T1/B1 sobre tecido de plantas contendo o cassete de expressão ZmUbi158-GUS.

Tabela 6. Dados de ensaio GUS T1/B1 sobre tecido de plantas contendo o cassete de expressão ZmUbi158-GUS.

ID Planta	Zigosidade	Fase de amostragem	Origem do tecido				Tratamento de tecido em reagente GUS ¹
			Caule logo				
			raiz	acima da raiz	Nó da espiga	nó abaixo do nó da espiga	
T1/F1	GUS						
A042A-16	Het	5 dias pré-polinização	5	4	4	4	A
A042A-10	Hom	6 dias pré-polinização	4	4	4	4	B
A053A-23	Het	5 dias pré-polinização	4	4	4	4	C
A053A-12	Het	5 dias pré-polinização	5	4	4	4	B
A072A-8	Hom	3 dias pré-polinização	4	4	3	4	B
A072A-23	Het	5 dias pré-polinização	4	4	4	4	B
A072A-1	Het	no dia da polinização	4	4	4	4	B
A042A-11	Hom	6 dias pós-polinização	5	4	4	4	D
A042A-15	Het	7 dias pós-polinização	4	4	3	4	C
A053A-18	Het	7 dias pós-polinização	4	4	4	4	E
A053A-21	Het	7 dias pós-polinização	4	4	4	4	B
A072A-18	Het	5 dias pós-polinização	5	4	4	4	B
A072A-25	Het	5 dias pós-polinização	5	4	4	4	B
A042A-18	Het	12 dias pós-polinização	5	4	3	4	B

Continuação...

ID Planta	Zigosidade	Fase de amostragem	Origem do tecido				Tratamento de tecido em reagente GUS ¹
			Caule logo				
			raiz	acima da raiz	Nó da espiga	nó abaixo do nó da espiga	
T1/F1	GUS						
A042A-22	Hom	16 dias pós-polinização	4	4	5	4	F
A042A-25	Het	17 dias pós-polinização	4	4	4	4	B
A053A-20	Hom	16 dias pós-polinização	4	3	3	4	G
A053A-15	Het	15 dias pós-polinização	4	4	4	4	B
A053A-28	Het	19 dias pós-polinização	4	3	3	4	B
A072A-27	Hom	15 dias pós-polinização	5	4	3	4	B
A072A-6	Het	17 dias pós-polinização	5	3	3	3	B
A072A-26	Het	23 dias pós-polinização	4	4	3	3	B

Tabela 6 - continuação.

ID Planta	Zigosi- dade	Fase de amostragem	Origem do tecido				Tratamento de tecido em reagente GUS ¹
			Caule em baixo				
			do ramo do pendão	Folha da espiga	Folha do pendão	Palha	
T1/F1	GUS						

A042A-16	Het	5 dias pré-polinização	3	1	1	5	A
A042A-10	Hom	6 dias pré-polinização	3	3	3	5	B
A053A-23	Het	5 dias pré-polinização	3	3	2	5	C
A053A-12	Het	5 dias pré-polinização	3	1	1	5	B
A072A-8	Hom	3 dias pré-polinização	3	2	2	5	B
A072A-23	Het	5 dias pré-polinização	3	1	1	5	B
A072A-1	Het	no dia da polinização	3	2	2	5	B
A042A-11	Hom	6 dias pós-polinização	3	3	3	5	D
A042A-15	Het	7 dias pós-polinização	3	3	3	5	C
A053A-18	Het	7 dias pós-polinização	3	2	3	5	E
A053A-21	Het	7 dias pós-polinização	3	3	2	5	B
A072A-18	Het	5 dias pós-polinização	3	2	2	5	B
A072A-25	Het	5 dias pós-polinização	3	2	2	5	B
A042A-18	Het	12 dias pós-polinização	3	1	1	5	B
Continuação...							

ID Planta	Zigosi-	Fase de amostragem	Origem do tecido				Tratamento de tecido em reagente GUS ¹
			Caule em baixo do ramo do	Folha da espiga	Folha do pendão	Palha	
T1/F1	dade						

	GUS		pendão				
A042A-22	Hom	16 dias pós-polinização	3	3	2	5	F
A042A-25	Het	17 dias pós-polinização	4	1	1	5	B
A053A-20	Hom	16 dias pós-polinização	3	1	1	5	G
A053A-15	Het	15 dias pós-polinização	3	2	1	5	B
A053A-28	Het	19 dias pós-polinização	3	2	2	5	B
A072A-27	Hom	15 dias pós-polinização	3	1	1	4	B
A072A-6	Het	17 dias pós-polinização	3	1	1	5	B
A072A-26	Het	23 dias pós-polinização	3	1	1	5	B

Tabela 6. continuação.

ID Planta T1/F1	Zigosidade GUS	Fase de amostragem	Origem do tecido			Tratamento de tecido em reagente GUS1
			cabelo	pendão	Espiga	
A042A-16	Het	5 dias pré-polinização	3	1	4	A
A042A-10	Hom	6 dias pós-polinização	2	1	3	B
A053A-23	Het	5 dias pré-polinização	2	1	3	C
A053A-12	Het	5 dias pré-polinização	3	1	4	B
A072A-8	Hom	3 dias pré-polinização	3	2	3	B

A072A-23	Het	5 dias pré-polinização	3	2	4	B
A072A-1	Het	no dia da polinização	2	1	3	B
A042A-11	Hom	6 dias pós-polinização	2	2	4	D
A042A-15	Het	7 dias pós-polinização	2	2	5	C
A053A-18	Het	7 dias pós-polinização	3	2	5	E
A053A-21	Het	7 dias pós-polinização	3	2	4	B
A072A-18	Het	5 dias pré-polinização	2	2	4	B
A072A-25	Het	5 dias pré-polinização	2	2	5	B
A042A-18	Het	12 dias pós-polinização	3	2	3	B
A042A-22	Hom	16 dias pós-polinização	3	2	3	F
Continuação...						

ID Planta T1/F1	Zigosidade GUS	Fase de amostragem	Origem do tecido			Tratamento de tecido em reagente GUS1
			cabelo	pendão	Espiga	
A042A-25	Het	17 dias pós-polinização	3	2	3	B
A053A-20	Hom	16 dias pós-polinização	3	2	3	G
A053A-15	Het	15 dias pós-polinização	3	2	3	B
A053A-28	Het	19 dias pós-polinização	2	1	4	B

A072A-27	Hom	15 dias pós-polinização	2	2	3	B
A072A-6	Het	17 dias pós-polinização	3	2	3	B
A072A-26	Het	23 dias pós-polinização	4	2	4	B

legenda: 0 = negativo; 1 = azul muito claro; 2 = azul claro; 3 = azul; 4 = azul escuro; 5 = azul muito escuro.

¹**A** indica todos os tecidos incubados à temperatura ambiente por 7 horas; **B** indica todos os tecidos incubados a 37°C por 16 horas; **C** indica folha da espiga, folha pendão, palha, cabelo, pendão incubados a 37°C por 16 horas, outros tecidos incubados à temperatura ambiente por 5 horas; **D** indica folha da espiga, folha pendão, palha, cabelo, pendão incubados a 37°C por 16 horas, outros tecidos incubados à temperatura ambiente por 6 horas; **E** indica folha da espiga, folha pendão, palha, cabelo, pendão incubados a 37°C por 16 horas, outros tecidos incubados à temperatura ambiente por 4 horas; **F** indica folha da espiga, folha pendão, palha incubados a 37°C por 16 horas, outros tecidos incubados à temperatura ambiente por 5 horas; **G** indica folha da espiga, folha pendão, palha incubados a 37°C por 16 horas, outros tecidos incubados à temperatura ambiente por 7 horas

[0070] Os dados apresentados na Tabela 6 demonstram que prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) é funcional em tecido de planta de milho, abrangendo SEQ ID N°: 2.

Exemplo 3: ZmUbi361

[0071] A sonda ZmUbi361 GeneChip, ZM066361_S_AT (SEQ ID N°: 16), foi usada para identificar cDNAs e gDNAs correspondentes em bancos de dados genômicos. Os cDNAs identificados incluem acesso TC369342-cDNA do TIGR (SEQ ID N°: 28). Os gDNAs incluem acessos AC196194 (SEQ ID N°: 29) e U29162.1 do GenBank (SEQ ID N°: 30), e sequência contígua MAGI_11628 de genoma do milho (SEQ ID N°: 31) e MAGI_56231 (SEQ ID N°: 32). Estas sequências foram usadas para desenvolver uma anotação em nível de base do gene ZmUbi361 (SEQ ID N°: 33).

[0072] O gene ZmUbi361 abrange dois éxons separados por um íntron. Os dados da sequência foram usados para projetar um cassete de expressão seguindo o método usado para fazer os cassetes de expressão OsMADS, conforme descrito no Pedido de Patente dos EUA, Publicação N.º 2007/0006344, incorporado neste instrumento por referência em sua totalidade. Antes do gene de interesse (GOI) o cassete de expressão concluído abrange a promotora ZmUbi361 contendo 1501 bp da sequência 5' não transcrita (SEQ ID N°: 51), uma sequência líder 5' não traduzida 260 bp

(SEQ ID N°: 52) que contém o ativador de tradução líder do vírus ETCH do tabaco (SEQ ID N°: 47) e termina em uma sequência Kozak de milho aperfeiçoada (ataaaccatgg) (SEQ ID N°: 8) e o íntron 1329 bp ZmUbi361 (SEQ ID N°: 53). A sequência de codificação da proteína ZmUbi361 foi silenciada realizando mutação dos códons de início de tradução e alterando outros códons para inserir paradas de tradução antes do local do códon de início de tradução projetado (no *NcoI*). A posterior da GOI, o cassete de expressão abrange uma sequência de terminador (SEQ ID N°: 54) derivado do gene ZmUbi361. Abrange uma sequência 65 bp 3' não traduzida (SEQ ID N°: 56) que inicia logo depois do códon de parada de tradução, mais 936 bp de sequência ZmUbi361 3' não transcrita (SEQ ID N°: 57). SEQ ID N°: 36 e 6 definem os vetores binários e de agrupamento de ZmUbi361, respectivamente. Em ambos os casos, o cassete de expressão ZmUbi361 (SEQ ID N°: 12) abrange o gene repórter β -glucuronidase (GUS).

[0073] O cassete de expressão prZmUbi361 (SEQ ID N°: 12) foi concebido conforme descrito acima e sintetizado, fornecido em pCR4-TOPO (SEQ ID N°: 58). SEQ ID N°: 12 foi extirpado como um fragmento *SanDI/RsrII* e ligado ao suporte principal da SEQ ID N°: 35. A sequência GUS foi extirpada de pNOV6901 como um fragmento *NcoI/SacI* e ligada ao cassete de expressão ZmUbi361.

[0074] O cassete de expressão prZmUbi361 (SEQ ID N°: 12) foi extirpado de 17267 como um fragmento *SanDI/RsrII* e ligado ao local *RsrII* no vetor receptor.

[0075] O vetor binário ZmUbi361 (SEQ ID N°: 6) foi transformado em milho por métodos de transformação bem conhecidos na técnica. Dos 36 eventos que foram produzidos, 21 deram semente. A Tabela 7 resume os dados de genotipação e produção de semente destes eventos. A transcrição GUS (mRNA) também foi quantificada em tecido de folha jovem. A enzima GUS em folhas totalmente expandidas foi testada por localização histoquímica e ELISA. Os dados T0 estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Produção de semente e dados histoquímicos GUS de ZmUbi361.

ID T0	Desvio pa-		Ensaio histo-	
	qRT-PCR média ¹	drão qRT-PCR	ELISA ²	químico GUS ³
MZDT080370A004A	11678	868	33369	+
MZDT080370A005A	2702	435	25468	+
MZDT080370A009A	27070	5245	22803	ND
MZDT080370A010A	5222	1796	25946	+
MZDT080370A013A	1824	2818	0	-
MZDT080370A014A	7057	1583	20540	+
MZDT080370A015A	12765	3402	10339	+
MZDT080370A016A	5653	3607	23552	+
MZDT080370A017A	20439	4158	22196	+
MZDT080370A018A	281	1615	83	ND
MZDT080370A019A	30303	8344	13361	+
MZDT080370A023A	3622	2775	27224	ND
MZDT080370A026A	12051	4177	999	+
MZDT080370A037A	9136	4081	17909	+
MZDT080370A037A	9136	4081	17909	+
MZDT080370A042A	8976	1526	0	-
MZDT080370A054A	2232	1285	62	ND
MZDT080370B003A	1861	1846	8477	+
MZDT080370B004A	1844	878	15541	ND
MZDT080370B006A	2786	444	2470	-
MZDT080370B007A	2655	1917	12099	+
MZDT080370B011A	1588	904	13895	+
MZDT080370B012A	1025	188	119	ND
MZDT080370B015A	2746	494	13559	+
MZDT080370B023A	583	183	411	ND
MZDT080370B027A	2803	232	8789	+

ID T0	Desvio pa-		Ensaio histo-	
	qRT-PCR média ¹	drão qRT-PCR	ELISA ²	químico GUS ³
MZDT080370B030A	279	313	2348	+
MZDT080370B034A	2008	387	15532	+
MZDT080370B037A	59	27	7020	+

¹ expressão relativa para controle endógeno (fator de alongamento 2 α)

² GUS como ng/mg de proteína solúvel

³ pontuado positivo (+) ou negativo (-); "ND" é

'sem dados'

[0076] Plantas T1 representando três eventos foram analisadas para determinar o desempenho do cassete de expressão de cassetes abrangendo a promotora ZmUbi361. A abordagem experimental incluiu dois estudos, um ensaio de mudas e um estudo de desenvolvimento. Ambos os tecidos de raiz e de folha de mudas T1/B1 foram analisados para verificar acúmulo de proteína GUS.

[0077] Dados de proteína repórter de GUS de mudas T1/F1 abrangendo ZmUbi361 estão na Tabela 8.

Tabela 8.

ID da muda da planta	Folha		Raiz	
	qRT-PCR ¹	GUS	qRT-PCR ¹	GUS
	GUS média	ELISA ²	GUS média	ELISA ²
MZDT080370A004A-49	7979	30845	1571	80553
MZDT080370A004A-52	11407	30000	1479	58166
MZDT080370A004A-53	3826	23497	498	39054
MZDT080370A004A-56	4802	36565	308	44148
MZDT080370A004A-58	11687	34059	629	124694
MZDT080370A004A-60	1877	23301	220	42975
MZDT080370A004A-62	2291	25754	225	18024
MZDT080370A004A-63	2192	27141	186	24458
MZDT080370A019A-49	1043	20846	116	35386
MZDT080370A019A-51	4429	30342	120	47939

ID da muda da planta	Folha		Raiz	
	qRT-PCR ¹	GUS	qRT-PCR ¹	GUS
	GUS média	ELISA ²	GUS média	ELISA ²
MZDT080370A019A-57	2806	20302	221	33528
MZDT080370A019A-58	2744	30727	832	66695
MZDT080370A019A-61	3024	23475	203	33301
MZDT080370A037A-49	1923	23776	55	35314
MZDT080370A037A-51	4284	37580	246	62985
MZDT080370A037A-57	1810	20640	182	22194
MZDT080370A037A-58	3121	31546	468	56957
MZDT080370A037A-59	1660	18300	129	23270

¹ unidades relativas

² proteína solúvel ng GUS/MG

[0078] O estudo de desenvolvimento demonstra o acúmulo espacial de proteína GUS em toda a planta. Para fazer isto, as plantas foram amostradas em três fases, no desenvolvimento reprodutivo inicial ou R1 (Ritchie e outros, 1992), pós-polinização ou R2 e desenvolvimento reprodutivo posterior (R3). Diversas partes da planta foram analisadas usando histoquímica. Os dados sugerem que ZmUbi158 é menos ativo no tecido reprodutivo em relação a tecidos vegetais; entretanto, é ativo no pólen.

[0079] Os dados da expressão de desenvolvimento de milho T1 transportando o cassete de expressão ZmUbi361 estão nas Tabelas 9A a 9D. Estes dados indicam que ZmUbi361 é mais ativo na raiz em comparação à folha. O desempenho quantitativo de ZmUbi361 é de 2 a 4 vezes superior do que de ZmUbi158. Na extremidade inferior, o acúmulo de proteína GUS representa 0,5 % de proteína solúvel e na extremidade superior, 4% da proteína extraível em mudas de cópia simples.

Tabela 9A. Plantas em fase V8.

ID da amostra	qRT-PCR	ELISA (ng
	GUS média	GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A004A-48, folha da raiz	845	56546
MZDT080370A004A-48, folha da espiga	851	71000
MZDT080370A004A-48, folha do pendão	556	45100
MZDT080370A004A-48 raiz	693	24328
MZDT080370A004A-34, folha da raiz	1639	51070
MZDT080370A004A-34, folha da espiga	1747	57133
MZDT080370A004A-34, folha do pendão	1044	49186
MZDT080370A004A-34 raiz	372	59888
MZDT080370A019A-24, folha da raiz	1328	53738
MZDT080370A019A-24, folha da espiga	837	34582
MZDT080370A019A-24, folha do pendão	1023	47660
MZDT080370A019A-24 raiz	188	33632
MZDT080370A019A-25, folha da raiz	1116	74705
MZDT080370A019A-25, folha da espiga	744	76802
MZDT080370A019A-25, folha do pendão	1051	46546
MZDT080370A019A-25 raiz	104	29022
MZDT080370A037A-10, folha da raiz	252	21606
MZDT080370A037A-10 completa	374	35817
MZDT080370A037A-10 antiga	567	61477
MZDT080370A037A-10 raiz	78	6514
MZDT080370A037A-26, folha da raiz	527	33135
MZDT080370A037A-26, folha da espiga	500	56219

ID da amostra	qRT-PCR	ELISA (ng
	GUS média	GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A037A-26, folha do pendão	432	26537
MZDT080370A037A-26 raiz	135	2202

Tabela 9B. Plantas em fase pré-polinização.

ID da amostra	qRT-PCR	ELISA (ng
	GUS média	GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A004A-17, folha da raiz	1540	88938
MZDT080370A004A-17, folha da espiga	1147	64255
MZDT080370A004A-17, folha do pendão	1351	69176
MZDT080370A004A-17 raiz	1471	41086
MZDT080370A004A-19, folha da raiz	758	94022
MZDT080370A004A-19, folha da espiga	2083	131137
MZDT080370A004A-19, folha do pendão	1921	106673
MZDT080370A004A-19 raiz	1583	50402
MZDT080370A019A-1, folha da raiz	813	118209
MZDT080370A019A-1, folha da espiga	1006	102875
MZDT080370A019A-1, folha do pendão	980	109279
MZDT080370A019A-1 raiz	479	32582
MZDT080370A019A-8, folha da raiz	1484	121832
MZDT080370A019A-8, folha da espiga	1143	93884
MZDT080370A019A-8, folha do pendão	179	14178
MZDT080370A019A-8 raiz	842	51992
MZDT080370A037A-8, folha da raiz	335	44419
MZDT080370A037A-8, folha da espiga	398	46079
MZDT080370A037A-8, folha do pendão	747	41610
MZDT080370A037A-8 raiz	811	20363
MZDT080370A037A-9, folha da raiz	877	30356

ID da amostra	qRT-PCR GUS média	ELISA (ng GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A037A-9, folha da espiga	224	37169
MZDT080370A037A-9, folha do pendão	1021	50858
MZDT080370A037A-9 raiz	640	20298

Tabela 9C. Plantas 9 dias pós-polinização.

ID da amostra	qRT-PCR GUS média	ELISA (ng GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A004A-2, folha da raiz	865	182913
MZDT080370A004A-2, folha da espiga	635	99395
MZDT080370A004A-2, folha do pendão	232	113087
MZDT080370A004A-2 raiz	178	37983
MZDT080370A004A-14, folha da raiz	306	87502
MZDT080370A004A-14, folha da espiga	497	126152
MZDT080370A004A-14, folha do pendão	387	68053
MZDT080370A004A-14 raiz	310	58438
MZDT080370A019A-28, folha da raiz	528	45088
MZDT080370A019A-28, folha da espiga	405	105005
MZDT080370A019A-28, folha do pendão	284	45817
MZDT080370A019A-28 raiz	148	33118
MZDT080370A019A-35, folha da raiz	564	56323
MZDT080370A019A-35, folha da espiga	632	53113
MZDT080370A019A-35, folha do pendão	507	108954
MZDT080370A019A-35 raiz	300	40700
MZDT080370A037A-2, folha da raiz	274	53902
MZDT080370A037A-2, folha da espiga	404	35963

ID da amostra	qRT-PCR GUS média	ELISA (ng GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A037A-2, folha do pendão	195	33632
MZDT080370A037A-2 raiz	32	15491
MZDT080370A037A-41, folha da raiz	269	44580
MZDT080370A037A-41, folha da espiga	273	25548
MZDT080370A037A-41, folha do pendão	199	30534
MZDT080370A037A-41 raiz	77	27373

Tabela 9D. Plantas 17 dias pós-polinização.

ID da amostra	qRT-PCR GUS média	ELISA (ng GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A004A-15, folha da espiga	2026	64833
MZDT080370A004A-15, folha do pendão	1102	54330
MZDT080370A004A-15, folha da raiz	591	47710
MZDT080370A004A-15 raiz	410	11077
MZDT080370A004A-25, folha do pendão	1103	43762
MZDT080370A004A-25, folha da espiga	1583	48255
MZDT080370A004A-25, folha da raiz	1283	52271
MZDT080370A004A-25 raiz	14	24261
MZDT080370A019A-32, folha do pendão	568	39362
MZDT080370A019A-32, folha da espiga	1318	27806
MZDT080370A019A-32, folha da raiz	769	47079
MZDT080370A019A-32 raiz	473	40498
MZDT080370A019A-38, folha do pendão	664	39359
MZDT080370A019A-38, folha da espiga	1171	40362

ID da amostra	qRT-PCR GUS média	ELISA (ng GUS/mg prote- ína solúvel)
MZDT080370A019A-38, folha da raiz	807	34531
MZDT080370A019A-38 raiz	197	22722
MZDT080370A037A-1, folha do pendão	409	23226
MZDT080370A037A-1, folha da espiga	622	17211
MZDT080370A037A-1, folha da raiz	691	28706
MZDT080370A037A-1 raiz	104	27698
MZDT080370A037A-39, folha do pendão	444	27268
MZDT080370A037A-39, folha da espiga	943	23569
MZDT080370A037A-39, folha da raiz	600	36720
MZDT080370A037A-39 raiz	421	17805

Exemplo 5. Funcionalidade da promotora em uma dicotiledônea

[0080] SEQ ID N°: 2 e 3 foram testadas em plantas de tabaco para determinar se estas promotoras, que foram projetadas de genes de monocotiledôneas, funcionariam como promotoras em dicotiledôneas. O tabaco é um organismo modelo e é útil como indicador de como será o desempenho dos cassetes de expressão em outras plantas dicotiledôneas, como a soja.

[0081] O cassete de expressão prZmUbi158-GUS (SEQ ID N°: 11) de plasmídeo 17222 (SEQ ID N°: 35) foi digerido com enzima de restrição com *SanDI* e *RsrII* e, subsequentemente, clonada no local *RsrII* do vetor binário 17680 (SEQ ID N°: 59) para criar o vetor 18271 (SEQ ID N°: 60). SEQ ID N°: 60 foi transformado em tabaco por transformação mediada por *Agrobacterium*. O desempenho de prZmUbi158 em plantas de tabaco T0 está registrado na Tabela 10, abaixo. Como os dados indicam, prZmUbi158, apesar de reter alguma função, não foi uma promotora altamente ativa no tabaco.

Tabela 10. Funcionalidade prZmUbi158 em plantas de tabaco T0.

ID planta T0	qRT-PCR¹ GUS, média	ELISA² GUS, média
TBUK095101A003A	393.6	ND
TBUK095101A004A	778.3	ND
TBUK095101A005A	1191.3	ND
TBUK095101A009A	490.6	ND
TBUK095101A010A	659.0	ND
TBUK095101A011A	789.9	ND
TBUK095101A012A	432.1	ND
TBUK095101A013A	618.5	41.1
TBUK095101A014A	572.5	ND
TBUK095101A015A	1161.9	10.3
TBUK095101A016A	328.1	ND
TBUK095101A019A	502.0	65.4
TBUK095101A020A	444.8	ND
TBUK095101A029A	1504.7	49.0
TBUK095101A030A	479.4	24.9
TBUK095101A031A	826.2	ND
TBUK095101A032A	399.4	ND
TBUK095101A035A	910.9	ND
TBUK095101A036A	502.1	23.9
TBUK095101A038A	2375.3	108.8
TBUK095101A040A	633.9	ND
TBUK095101A042A	328.4	ND
TBUK095101A043A	0.0	ND
TBUK095101A044A	423.5	ND
TBUK095101A048A	533.2	ND
TBUK095101A052A	561.1	ND
TBUK095101A053A	802.3	ND
TBUK095101A054A	0.0	ND
TBUK095101A055A	414.0	ND
TBUK095101A056A	1015.8	ND
TBUK095101A057A	773.5	ND

Tabela 10 - continuação.

ID planta T0	qRT-PCR ¹ GUS, média	ELISA ² GUS, média
TBUK095101A058A	516.6	47.3
TBUK095101A061A	507.4	ND
TBUK095101A062A	478.8	79.5
TBUK095101A073A	335.5	ND
TBUK095101A074A	152.6	ND
TBUK095101A077A	665.6	777.9
TBUK095101A078A	374.5	ND
TBUK095101A080A	802.1	78.5
TBUK095101A083A	1063.9	14.9
TBUK095101A085A	ND	ND
TBUK095101A093A	604.1	ND
TBUK095101A097A	878.3	30.1
TBUK095101A105A	1410.2	90.2
TBUK095101A106A	448.7	ND
TBUK095101A107A	1101.8	ND

¹ unidades relativas

² proteína solúvel ng GUS/mg

[0082] O cassete de expressão prZmUbi361-GUS (SEQ ID N°: 12) de plasmídeo 17267 (SEQ ID N°: 36) foi digerido com enzima de restrição com *SanDI* e *RsrII* e, subsequentemente, clonada no local *RsrII* do vetor binário 17680 (SEQ ID N°: 59) para criar o vetor 18272 (SEQ ID N°: 61). SEQ ID N°: 61 foi transformado em tabaco por transformação mediada por *Agrobacterium*. O desempenho de prZmUbi361 em plantas de tabaco T0 está registrado na Tabela 11, abaixo. Como os dados indicam, prZmUbi361 foi altamente ativo no tabaco. Estes dados indicam que prZmUbi361 é uma promotora desejável para utilização em plantas dicotiledôneas bem como em plantas monocotiledôneas.

Tabela 11. funcionalidade prZmUbi361 em tabaco T0.

ID planta T0	qRT-PCR¹ GUS, média	ELISA² GUS, média
TBUK094700A001A	5856.2	10842.2
TBUK094700A002A	6881.8	7207.2
TBUK094700A005A	12766.1	12169.3
TBUK094700A006A	9091.4	8875.0
TBUK094700A007A	5113.1	9564.3
TBUK094700A008A	5522.6	11472.5
TBUK094700A013A	11268.9	5118.4
TBUK094700A015A	4844.7	4285.6
TBUK094700A018A	4786.9	2226.1
TBUK094700A029A	8553.3	7242.9
TBUK094700A030A	3914.4	7201.3
TBUK094700A031A	5015.4	7552.5
TBUK094700A032A	4346.7	8058.6
TBUK094700A033A	5864.9	7257.5
TBUK094700A034A	10132.3	4906.8
TBUK094700A036A	3564.0	5246.3
TBUK094700A037A	342.1	321.4
TBUK094700A040A	1433.7	1445.2
TBUK094700A041A	6469.6	8130.8
TBUK094700A042A	7879.8	6893.7
TBUK094700A044A	8446.7	8175.6
TBUK094700A045A	2213.9	7705.1
TBUK094700A046A	6353.3	11685.4
TBUK094700A047A	4208.4	7426.4
TBUK094700A049A	3256.9	8271.0
TBUK094700A051A	5179.8	5079.5
TBUK094700A054A	3143.6	11610.8
TBUK094700A057A	1190.2	4514.2
TBUK094700A060A	7388.2	9830.9
TBUK094700A064A	15573.6	15832.6

ID planta T0	qRT-PCR ¹ GUS, média	ELISA ² GUS, média
TBUK094700A065A	1604.9	7166.2
TBUK094700A072A	3554.8	7492.6
TBUK094700A073A	5245.1	7534.7
TBUK094700A074A	3974.3	8657.1
TBUK094700A079A	3035.4	7916.9
TBUK094700A081A	3110.6	5416.6
TBUK094700A082A	5251.6	9757.1

Tabela 11, continuação.

ID planta T0	qRT-PCR ¹ GUS, média	ELISA ² GUS, média
TBUK094700A084A	4574.1	8151.2
TBUK094700A088A	4382.5	8554.8
TBUK094700A089A	2358.4	11864.6
TBUK094700A090A	3696.9	8756.8
TBUK094700A091A	4549.6	8392.9
TBUK094700A092A	2043.6	712.4
TBUK094700A096A	186.8	ND
TBUK094700A097A	3204.9	13351.1
TBUK094700A104A	1182.5	1390.8

¹ unidades relativas² proteína solúvel ng GUS/mg

Exemplo 6. Aprimoramento de promotora

[0083] SEQ ID N°: 1-3 são modificadas sequencialmente para excluir da região 5', e a cada 200 bp, uma parte da sequência promotora original. As exclusões são feitas usando métodos bem conhecidos por qualquer profissional habilitado na técnica, incluindo PCR, mutagênese e síntese de gene. As séries de exclusões são, então, ligadas a vetores binários compilados com *XhoI/NcoI*, respectivamente, para substituir as promotoras originais. A construção do fragmento GUS da nova promotora é introduzida em monocotiledôneas e dicotiledôneas usando o método de ensaio transiente descrito no Pedido de Patente Provisório dos EUA N°: 61/186.025, incorporado neste instrumento por referência em sua totalidade, e por transforma-

ção mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para gerar plantas transgênicas.

[0084] A expressão GUS nestas plantas transgênicas é examinada por ensaio de atividade e ensaio histoquímico em tecido de raiz e folha, conforme descrito acima. Ao comparar as atividades GUS em diversas construções de exclusão e construções da promotora original, os fragmentos 5' conferindo atividade de promotora funcional são identificados como fragmentos de promotora funcional e classificados com base no tamanho. Com isto, o menor fragmento de promotora funcional da sequência da promotora original é determinado.

[0085] Uma série de substituições de base nos menores fragmentos da promotora original é gerada por síntese de gene química direta. Além disso, códons de início indesejados são assim silenciados. Estes mutantes são clonados para gerar outro conjunto de construções GUS de promotora. A expressão GUS destas construções em plantas transgênicas tem a medida determinada usando os métodos descritos acima. Domínios essenciais nos menores fragmentos funcionais, em que substituições de base anulam a atividade da promotora, são assim determinados.

[0086] Os cassetes de expressão também podem ser aprimorados removendo ou adicionando ativadores de transcrição ou de tradução. Como exemplo, sem limitação, o cassete de expressão abrange uma promotora selecionada do grupo abrangendo SEQ ID N°: 1, 2, e 3. Como exemplo adicional, o cassete de expressão também abrange os ativadores de transcrição eFMV (nucleotídeos 306 - 499 da SEQ ID N°: 6) e e35S (nucleotídeos 506 - 798 da SEQ ID N°: 6) imediatamente antes da promotora. Como exemplo adicional, o cassete de expressão também abrange o ativador de tradução líder do vírus do mosaico do tabaco (SEQ ID N°: 7) imediatamente a posterior da promotora. Como exemplo adicional, o cassete de expressão também abrange uma sequência Kozak (SEQ ID N°: 8 ou SEQ ID N°: 9) imediatamente antes do códon de início do gene de interesse.

Conclusão

[0087] Considerando os resultados indicados aqui, um objeto

desta invenção é fornecer um ácido nucleico, preferencialmente um ácido nucleico isolado, capaz de orientar a expressão em uma célula da planta, em que a sequência de ácido nucleico abrange uma região 5'-não traduzida, um primeiro éxon, um primeiro íntron, e uma parte de um segundo éxon de um gene representado por uma sequência selecionada do grupo abrangendo a SEQ ID N°: 13-33. A invenção também se relaciona à sequência de ácido nucleico selecionada do grupo abrangendo a SEQ ID N°: 1-3. Em outro aspecto, a célula da planta abrangendo o ácido nucleico pode ser uma célula monocotiledônea ou uma célula dicotiledônea. Em ainda outro aspecto, a célula da planta abrangendo o ácido nucleico pode ser uma célula de milho ou uma célula de tabaco.

[0088] Em outro aspecto, um objeto da presente invenção é relacionar a um método de expressão de um gene heterólogo abrangendo a construção de um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3), em que o cassete de expressão seja funcional em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte; e criando uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que o gene heterólogo seja expresso. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma monocotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja milho. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma dicotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja tabaco ou soja.

[0089] A presente invenção também se relaciona a uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3). A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma monocotiledônea. A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja milho. A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma dicotiledônea. A invenção também se relaciona à planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja tabaco ou soja.

[0090] A presente invenção também se relaciona a um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3).

[0091] A presente invenção também se relaciona a uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte feita pelo método de expressão de um gene heterólogo abrangendo a construção de um cassete de expressão abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3), em que o cassete de expressão seja funcional em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte; e criando uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte abrangendo o cassete de expressão, em que o gene heterólogo seja expresso. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta,

célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma monocotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja milho. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja uma dicotiledônea. A invenção também se relaciona à expressão do gene heterólogo em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte em que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte seja selecionada do grupo abrangendo tabaco e soja. Em outro aspecto, a presente invenção também se relaciona à progênie da planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte, abrangendo uma promotora selecionada do grupo abrangendo prZmHSP70 (SEQ ID N°: 1), prZmUbi158 (SEQ ID N°: 2) e prZmUbi361 (SEQ ID N°: 3). A presente invenção também se relaciona à semente derivada da progênie da planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte. A presente invenção também se relaciona aos grãos derivados da progênie da planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte.

[0092] A presente invenção também se relaciona a uma sequência de ácido nucleico capaz de orientar a expressão em uma célula da planta, em que a sequência de ácido nucleico abrange uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo abrangendo (a) uma sequência de ácido nucleico que seja pelo menos 80% idêntica a uma das SEQ ID N°: 1-3; (b) uma sequência de ácido nucleico que é um fragmento funcional de uma das SEQ ID N°: 1-3; e (c) uma sequência de ácido nucleico que se hibridiza sob condições rigorosas a uma das SEQ ID N°: 1-3.

BIBLIOGRAFIA

Iyer M., Wu L., e outros V (2001) Two step transcriptional amplification as a method for imaging reporter gene expression using weak promoters PNAS 98(25):14595-14600.

Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Pollock, S., e Marks, M.D.

(1993) Arabidopsis GLABROUS1 gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell*. 5(12): 1739-1748.

Sieburth, L.E., e Meyerowitz, E.M. (1997) Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell*. 9(3): 355-365.

Batzer, et al (1991) Enhanced evolutionary PCR using oligonucleotides with inosine at the 3'-terminus. *Nucleic Acid Res.* 19:5081.

Ohtsuka, et al (1985) An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608.

Rossolini, et al (1994) Use of deoxyinosine-containing primers vs degenerate primers for polymerase chain reaction based on ambiguous sequence information. *Mol. Cell Probes* 8:91-98.

Paszkowski et al (1984). Direct Gene Transfer to Plants. *EMBO J* 3:2717-2722

Potrykus et al (1985) Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. *Mol. Gen. Genet.* 199:169-177

Reich et al (1986) Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti-plasmids. *Bio/Technology* 4:1001-1004

Klein et al (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.

Uknes et al (1993) Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* 5:159-169

Hofgen, R, e Willmitzer, L (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acid Res.* 16:9877

Schocher et al (1986) Co-transformation of foreign genes into plants. *Bio/Technology* 4:1093-1096

Gordon-Kamm et al (1990) Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *Plant Cell* 2:603-618

Fromm et al (1990) Inheritance and expression of chimeric genes

in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8:833-839.

Koziel et al (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11:194-200

Vasil et al (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10:667-674

Vasil et al (1993) Rapid production of transgenic plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/Technology* 11:1553-1558

Weeks et al (1993) Rapid Production of Multiple Independent Lines of Fertile Transgenic Wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 1102:1077-1084

Murashiga et al (1962) A revised medium for rapid growth and bio-essays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Negrotto et al (2000) The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports* 19:798-803

Eastmond, P.J., van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeeckens, S.C., Graham, I.A. (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* 29, 225-235.

Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., (1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J.* 16, 487-496.

Ranocha, P., McNeil, S.D., Ziemak, M.J., Li, C., Tarczynski, M.C., e Hanson, A.D. (2001). The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity. *Plant J.* 25, 575-584.

Ritchie, S.W., Hanway, J.J., Benson, G.O. (1997). How a Corn Plant Develops. Special Report No. 48. Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service. Ames, Iowa.

Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E.J., Raymond, P., Rolin, D. (2002b). The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *J. Biol. Chem.* 277, 42948-43960.

Vogel, G., Aeschbacher, R.A., Müller, J., Boller, T. e Wiemken, A. (1998). Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J.* 13, 673-683.

Wingler, A. (2002). The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochem.* 60, 437-440.

Armenta, R. T. Tarnowski, I. Gibbons, e E.F. Ullman (1985) Improved Sensitivity in Homogeneous Enzyme Immunoassays using a Fluorogenic Macromolecular Substrate: an Assay for Serum Ferritin, *Analytical Biochemistry*, 146:211-219.

Ebert P., Ha S., An, G., Identification of an essential upstream element in the nopaline synthase promoter by stable and transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 84:5745-5749 (1987)

Lawton M., Tierney M, Nakamura I., Anderson E., Komeda Y., Dube P., Hoffman N., Fraley R., Beachy R., Expression of a soybean β -conclycinin gene under the control of the Cauliflower Mosaic Virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissues. *Plant Mol. Biol.* 9:315-324 (1987)

Odell J., Nagy F., Chua N., Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812 (1985)

Sanger M., Daubert S., Goodman R., Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol. Biol.* 14, 433-43 (1990)

Pellegrineschi A., Kis M., Dix I., Kavanagh T., Dix P., Expression of horseradish peroxidase in transgenic tobacco. *Biochem. Soc. Trans.* 23(2):247-250 (1995)

Walker J., Howard E., Dennis, E., Peacock W., DNA sequences required for anaerobic expression of the maize alcohol dehydrogenase 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 84:6624-6628 (1987)

Yang N., Russell D., Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of Gus gene in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 87:4144-8 (1990)

Chandler V., Radicella J., Robbins T., Chen J., Turks D., Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. *Plant Cell* 1:1175-1183 (1989)

Batzer M., Carlton J., Deininger P., Enhanced evolutionary PCR using oligonucleotides with inosine at the 3'-terminus. *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)

Ohtsuka E., Matsuki S., Ikehara M., Takahashi Y., Matsubara K., An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985)

Rossolini G., Cresti S., Ingianni A., Cattani P., Riccio M., Satta G., Use of deoxyinosine-containing primers vs. degenerate primers for polymerase chain reaction based on ambiguous sequence information. *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)

Ingelbrecht I., Herman L., Dekeyser R., Van Montagu M., Depicker A., Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell* 1:671-680 (1989)

Sambrook, J. e outros, In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nova York, 1989

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K., Eds.; In *Current Protocols in Molecular Biology*; John Wiley & Sons: Nova York, 1990

Geiser M., Schweitzer S., Grimm C., The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. kurstaki HD1.

(1986) Gene 48:109-118

Van Damme E., Smeets K., Van Leuven F., Peumans W., Molecular cloning of mannose-binding lectins from *Clivia miniata*. (1994) Plant Mol. Biol. 24:825-830

Castle L., Siehl D., Gorton R., Patten P., Chen Y., Bertain S., Cho H., Duck N., Wong J., Liu D., Lassner M. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. (2004) Science 304, 1151-1154

Cheng M., Jarret R., Zhijian L., Xing A., Demski J., Production of fertile transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 15:653-657 (1996)

Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Hironaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y., Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 15:971-980 (1997)

McKently A., Moore G., Doostdar H., Neidz R., *Agrobacterium*-mediated transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryo axes and the development of transgenic plants. Plant Cell Rep. 14:699-703 (1995)

Newell, C. A., Plant Transformation Technology. Mol. Biotechnol. 16:53-65 (2000)

Weissbach e Weissbach, Eds.; In Methods for Plant Molecular Biology; Academic Press, Inc.: San Diego, Calif., 1988

Maliga e outros, In Methods in Plant Molecular Biology; Cold Spring Harbor Press, 1995

Birren e outros, In Genome Analysis: Detecting Genes, 1; Cold Spring Harbor: Nova York, 1998

Birren e outros, In Genome Analysis: Analyzing DNA, 2; Cold Spring Harbor: Nova York, 1998

Clark, Ed., In Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual; Springer: Nova York, 1997

Jones J., Dunsmuir P., Bedbrook J., High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. EMBO J. 4:2411-2418 (1985)

De Almeida E., Gossele V., Muller C., Dockx J., Reynaerts A.,

Botterman J., Krebbers E., Timko M., Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter: Sequences encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. Mol. Gen. Genetics 218:78-86 (1989)

Komarnytsky, S., Boris, N., Functional analysis of promoter elements in plants. Genetic Engineering 25: 113-141 (2003)

REIVINDICAÇÕES

1. Sequência de ácido nucleico **caracterizada** por compreender a SEQ ID Nº: 2 e pelo menos um fragmento de um ácido nucleico heterólogo.

2. Método de expressão de um gene heterólogo **caracterizado** por compreender:

a) construção de um cassete de expressão compreendendo a SEQ ID Nº: 2, em que o cassete de expressão é funcional em uma planta, célula da planta, ou tecido da planta; e

b) criação de uma planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte, compreendendo o cassete de expressão, em que o gene heterólogo é expresso.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte é uma monocotiledônea.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a planta, célula da planta, ou tecido da planta ou respectiva parte é milho.

5. Cassete de expressão **caracterizado** por compreender a SEQ ID Nº: 2.