



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

(21) BR 102014032957-9 A2



(22) Data do Depósito: 30/12/2014

(43) Data da Publicação: 17/07/2018

(54) Título: PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MILHO

(51) Int. Cl.: C12N 15/82; C12N 15/63; A01H 5/00; C12N 15/113

(30) Prioridade Unionista: 31/12/2013 US 61/922,529

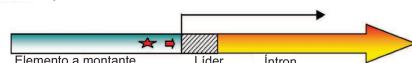
(73) Titular(es): DOW AGROSCIENCES LLC

(72) Inventor(es): MANJU GUPTA; SANDEEP KUMAR; TERRY R. WRIGHT; SUSAN M. JAYNE; DOUG A. SMITH; DIAA ALABED

(74) Procurador(es): DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA - API 192

(57) Resumo: RESUMO Patente de Invenção: "PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MILHO".

A presente invenção refere-se ao promotor de Ubiquitina-1 de Zea mays c.v. B73 (Ubi-1 de Z. mays c.v. B73), que comanda altos níveis de expressão constitutiva de transgene em plantas. Uso repetido do mesmo promotor Ubi-1 de Z. mays c.v. B73 em construtos com múltiplos genes pode também levar ao silenciamento gênico, deste modo, tornando os produtos transgênicos menos eficazes. São fornecidos elementos promotores reguladores gênicos, construtos e métodos para expressão de um transgene em células de plantas e/ou tecidos de planta usando elementos reguladores gênicos do promotor Ubi-1 de uma espécie Zea diferente, Z. luxurians v1.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**CASSETES DE EXPRESSÃO GÊNICA, VETORES RECOMBINANTES, SEQUÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO PURIFICADA, E MÉTODOS PARA EXPRESSÃO DE UMA SEQUÊNCIA CODIFICANTE HETERÓLOGA EM UMA PLANTA TRANSGÊNICA, E PARA O ISOLAMENTO DE UMA SEQUÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO**".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício sob 35 USC § 119(e) do Pedido Provisório dos Estados Unidos N° de Série 61/922.529, depositado em 31 de Dezembro de 2013, a descrição completa do qual é aqui incorporada por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se, em geral, ao campo da biologia molecular de plantas e, mais especificamente, ao campo de expressão de transgenes em plantas.

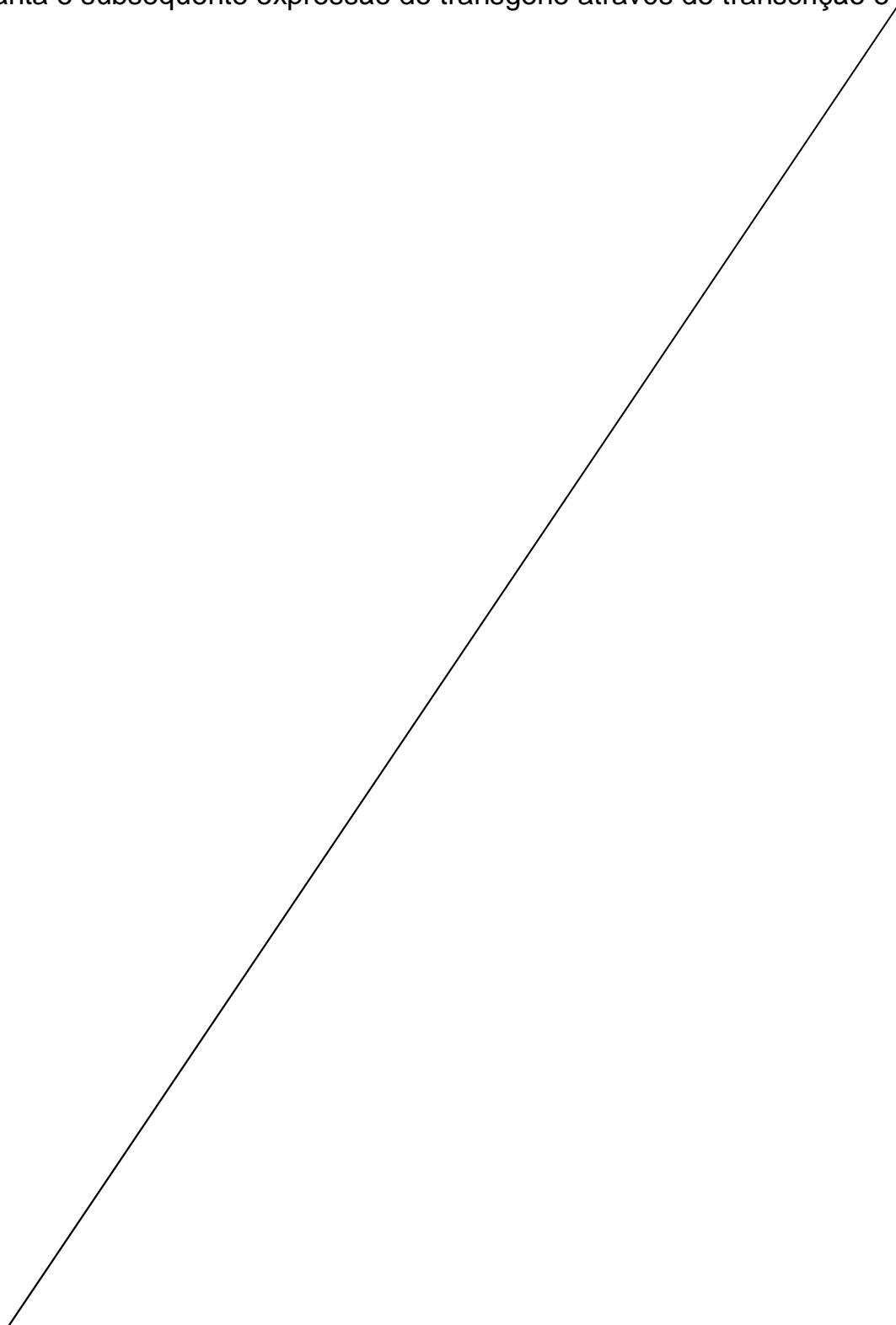
ANTECEDENTES

[003] Muitas espécies de plantas são capazes de serem transformadas com transgenes para introduzir traços ou características agronomicamente desejáveis. Espécies de plantas são desenvolvidas e/ou modificadas para terem traços desejáveis particulares. Geralmente, traços desejáveis incluem, por exemplo, melhora da qualidade de valor nutricional, aumento do rendimento, conferir resistência às doenças ou pragas, aumento da tolerância à estiagem e ao estresse, melhora de qualidades hortícolas (por exemplo, pigmentação e crescimento), conferir resistência a herbicidas, permitir a produção de compostos e/ou materiais industrialmente úteis a partir da planta e/ou permitir a produção de produtos farmacêuticos.

[004] Espécies de plantas transgênicas compreendendo múltiplos transgenes empilhados em um único *locus genômico* são produzidas por meio de tecnologias de transformação de plantas. Tecnologias de

Segue-se na folha 1a/80

transformação de plantas resultam na introdução de um transgene em uma célula de planta, recuperação de uma planta transgênica fértil que contém a cópia estavelmente integrada do transgene no genoma da planta e subsequente expressão do transgene através de transcrição e



Segue-se na folha 2/80

tradução do genoma da planta resulta em plantas transgênicas que possuem traços e fenótipos desejáveis. No entanto, mecanismos que permitam a produção de espécies de plantas transgênicas para alta expressão de múltiplos transgenes manipulados como uma pilha de traços são desejáveis.

[005] Da mesma forma, mecanismos que permitam a expressão de um transgene dentro de determinados tecidos ou órgãos de uma planta são desejáveis. Por exemplo, aumento da resistência de uma planta à infecção por patógenos provenientes do solo poderia ser obtido por meio de transformação do genoma de uma planta com um gene de resistência a patógeno, de modo que a proteína de resistência ao patógeno seja expressa de forma robusta nas raízes da planta. Alternativamente, pode ser desejável expressar um transgene em tecidos de plantas que estão em uma fase de crescimento ou desenvolvimento particular tal como, por exemplo, divisão celular ou alongamento.

[006] São descritos aqui elementos reguladores de promotor Ubi-1 de *Zea luxurians*, incluindo promotores, promotores a montante, 5'-UTRs e íntrons. Além disso, são descritos construtos e métodos que utilizam elementos de regulação gênica.

SUMÁRIO

[007] São descritos aqui promotores, construtos e métodos para a expressão de um transgene em células de plantas e/ou tecidos de planta. Em uma modalidade, expressão de um transgene compreende o uso de um promotor. Em uma modalidade, um promotor compreende uma sequência de polinucleotídeo. Em uma modalidade, uma sequência de polinucleotídeo promotora compreende um promotor a montante, uma região 5' não traduzida (5'-UTR) ou sequência líder e um íntron. Em uma modalidade, uma sequência de polinucleotídeo promotora compreende o gene de Ubiquitina-1 (Ubi-1). Em uma modalidade, uma sequência de polinucleotídeo promotora compreende o gene Ubi-

1 de *Zea luxurians* (*Z. luxurians*).

[008] Em uma modalidade, um construto inclui um cassete de expressão gênica compreendendo uma sequência de polinucleotídeo promotora que foi obtida a partir do gene Ubi-1 de *Z. luxurians*. Em uma modalidade, a sequência de polinucleotídeo promotora de Ubi-1 de *Z. luxurians* compreende uma região promotora a montante, uma sequência 5'-UTR ou uma sequência líder e um íntron. Em uma modalidade, um construto inclui um cassete de expressão gênica compreendendo uma sequência de polinucleotídeo promotora obtida a partir do gene Ubi-1 de *Z. luxurians* fundida a um íntron do gene que codifica a proteína fluorescente amarela da espécie *Phialidium* (*PhYFP*). Em uma modalidade, um construto inclui um cassete de expressão gênica compreendendo uma sequência de polinucleotídeo promotora obtida a partir do gene Ubi-1 de *Z. luxurians* fundido a um íntron do gene que codifica a proteína fluorescente amarela da espécie *Phialidium* (*PhYFP*), seguido por uma região 3' não traduzida (3'-UTR) do gene de Peroxidase 5 de *Z. mays*. (*ZmPer5*). A sequência de polinucleotídeo resultante compreende um novo elemento regulador gênico promotor.

[009] Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica inclui um elemento regulador promotor gênico operativamente ligado a um transgene ou uma sequência de codificação heteróloga. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica inclui pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais transgenes.

[0010] Métodos de crescimento das plantas que expressam um transgene usando os novos elementos reguladores promotores gênicos (por exemplo, um promotor a montante, 5'-UTR e íntron) são descritos aqui. Métodos de cultura de tecidos e células de plantas que expressam um transgene usando o novo elemento regulador promotor gênico também são descritos aqui. Em uma modalidade, métodos, conforme descrito aqui, incluem expressão constitutiva do gene em

folhas de plantas, raízes, caules e pólen. Métodos de purificação de uma sequência de polinucleotídeo que compreende o novo elemento regulador promotor gênico também são descritos aqui.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0011] A Figura 1 mostra um esquema de um novo promotor compreendendo o gene de Ubi-1 c.v. B73 de *Zea mays*. O promotor é composto de um elemento a montante, uma 5'-UTR ou uma sequência líder e um ítron. O elemento a montante está localizado a 5' montante do Sítio de Início de Transcrição (Transcription Start Site - TSS), indicado pela seta longa. O elemento a montante é compreendido de elementos reguladores, tal como uma caixa TATA, indicada pela seta curta, e um elemento de choque térmico, indicado pela estrela.

[0012] A Figura 2 mostra o mapa de plasmídeo para vetor pDAB105710 que compreende a sequência promotora amplificada por PCR do gene Ubi1 de *Z. luxurians* v1.

[0013] A Figura 3 mostra a sequência de polinucleotídeos de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 de controle (SEQ ID NO: 1) com a região promotora a montante sublinhada, a 5'-UTR/sequência líder sombreadas e a região intrônica em letras minúsculas.

[0014] A Figura 4 mostra a sequência de polinucleotídeo do promotor de Ubi-1 *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) com a região promotora a montante sublinhada, a 5'-UTR/sequência líder sombreadas e a região intrônica em letras minúsculas.

[0015] A Figura 5 mostra o alinhamento da sequência de polinucleotídeo das regiões promotoras a montante de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 4) comparada com a sequência promotora a montante de *Z. Mays* c.v B73 de controle (SEQ ID NO: 3).

[0016] A Figura 6 mostra o alinhamento de sequências de polinucleotídeo das regiões 5'-UTR/líder de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 6) em comparação com a 5'-UTR/sequência líder de *Z. mays* c.v. B73 de

controle (SEQ ID NO: 5).

[0017] A Figura 7 mostra o alinhamento da sequência de polinucleotídeo das regiões intrônicas de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 8) em comparação com a sequência intrônica de *Z. mays* c.v. B73 de controle (SEQ ID NO: 7).

[0018] A Figura 8 mostra um mapa de vetor do construto de expressão binário, pDAB105748, compreendendo o vetor entrada de controle, pDAB105742 (*Z. mays* c.v. B73), inserido no vetor de destino, pDAB10197.

[0019] A Figura 9 mostra um mapa de vetor do construto de expressão binário, pDAB105743, compreendendo o vetor de entrada, pDAB105737 (*Z. luxurians* v1), inserido no vetor de destino, pDAB10197.

[0020] A Figura 10 mostra a expressão do gene *PhiYFP* em caules de plantas T₀ para construtos de expressão binários pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) e pDAB105743 (*Z. luxurians* v1).

[0021] A Figura 11 mostra a expressão do gene *PhiYFP* em pólen de plantas T₁ para construtos de expressão binários pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73), pDAB105743 (*Z. luxurians* v1) e um controle negativo.

[0022] A Figura 12 mostra um mapa de vetor do construto de expressão binário, pDAB112853, compreendendo o gene repórter *PhiYFP* e a 3'-UTR de *ZmPer5* comandada por um promotor *ZmUbi-1* v2 e o gene de *AAD-1* v3 e 3'-UTR de *ZmLip* v1 comandada por *Z. luxurians* v1.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Definições

[0023] Conforme usado aqui, os artigos, "um", "uma" e "o", "a" incluem as referências no plural, a menos que o contexto oriente claramente e sem ambiguidade o contrário.

[0024] Conforme usado aqui, o termo "retrocruzamento" refere-se

a um processo no qual um produtor cruza a descendência híbrida novamente com um dos pais, por exemplo, um híbrido de primeira geração F1 com um dos genótipos parentais do híbrido F1.

[0025] Conforme usado aqui, o termo "ítron" é definido como qualquer sequência de ácido nucleico compreendida em um gene (ou sequência de nucleotídeos de interesse expresso) que é transcrita, mas não traduzida. Ítrons incluem a sequência de ácido nucleico não traduzida dentro de uma sequência de DNA expressa, bem como a sequência correspondente em moléculas de RNA transcritas das mesmas.

[0026] Um construto descrito aqui também pode conter sequências que aumentam a tradução e/ou estabilidade do mRNA, tal como ítrons. Um exemplo de tal ítron é o primeiro ítron do gene II da variante de histona H3 de *Arabidopsis thaliana* ou qualquer outra sequência intrônica comumente conhecida. Os ítrons podem ser usados em combinação com uma sequência de promotor para aumentar a tradução e/ou estabilidade do mRNA.

[0027] Conforme usado aqui, os termos "região não traduzida 5'" ou "5'-UTR" são definidos como o segmento não traduzido na extremidade 5' de pré-mRNA ou mRNA maduro. Por exemplo, sobre mRNA maduro, uma 5'-UTR abriga, tipicamente, em sua extremidade 5', um *cap* de 7-metilguanosina e está envolvida em muitos processos, tais como *splicing*, poliadenilação, exportação de mRNA para o citoplasma, identificação da extremidade 5' do mRNA pela maquinaria de tradução e proteção dos mRNAs contra degradação.

[0028] Conforme usado aqui, o termo "região não traduzida 3'" ou "3'-UTR" é definido como o segmento não traduzido em um término 3' do pré-mRNA ou mRNA maduro. Por exemplo, sobre o mRNA maduro, esta região abriga a cauda poli(A) e é conhecida por ter vários papéis na estabilidade do mRNA, início de tradução e exportação de mRNA.

[0029] Conforme usado aqui, o termo "sinal de poliadenilação" de-

signa uma sequência de ácido nucleico presente em transcritos de mRNA que permite que os transcritos, quando na presença de uma poli(A) polimerase, sejam poliadenilados no sítio de poliadenilação, por exemplo, localizado 10 a 30 bases a jusante do sinal de poli(A). Muitos sinais de poliadenilação são conhecidos na técnica e são úteis para a presente invenção. Uma sequência exemplificativa inclui AAUAAA e variantes da mesma, conforme descrito em J. Loke et al, (2005) *Plant Physiology* 138 (3); 1457-1468.

[0030] Conforme usado aqui, o termo "isolado" refere-se a um componente biológico (incluindo um ácido nucleico ou proteína) que foi separado de outros componentes biológicos na célula do organismo na qual o componente ocorre naturalmente (isto é, DNA extracromossômico e outros cromossômicos).

[0031] Conforme usado aqui, o termo "purificado", em referência às moléculas de ácido nucleico, não requer uma pureza absoluta (tal como um preparado homogêneo). Em vez disso, "purificado" representa uma indicação de que a sequência é relativamente mais pura do que em seu ambiente celular nativo. Por exemplo, o nível "purificado" de ácidos nucleicos deve ser pelo menos 2-5 vezes maior em termos de níveis de concentração ou expressão gênica quando comparado com o nível natural.

[0032] As moléculas de DNA reivindicadas podem ser obtidas diretamente a partir de DNA total ou de RNA total. Além disso, clones de cDNA não ocorrem naturalmente mas, antes, são obtidos, de preferência, através de manipulação de uma substância de ocorrência natural parcialmente purificada (RNA mensageiro). A construção de uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA envolve a criação de uma substância sintética (cDNA). Clones de cDNA individuais podem ser purificados a partir da biblioteca sintética por meio de seleção clonal das células que trazem a biblioteca de cDNA. Assim, o processo o qual

inclui a construção de uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA e purificação de clones de cDNA distintos proporciona uma purificação de aproximadamente 10^6 vezes da mensagem nativa. Da mesma forma, uma sequência de DNA do promotor pode ser clonada em um plasmídeo. Tal clone não é de ocorrência natural, mas, antes, é obtido, de preferência, através de manipulação de uma substância que ocorre naturalmente purificada parcialmente, tal como uma biblioteca de DNA genômico. Assim, purificação de pelo menos uma ordem de magnitude, de preferência duas ou três ordens e, mais preferivelmente, quatro ou cinco ordens de magnitude, é favorecida nestas técnicas.

[0033] Similarmente, purificação representa uma indicação de que uma alteração química ou funcional na sequência de DNA componente ocorreu. Moléculas de ácidos nucleicos e proteínas que tenham sido "purificados" incluem moléculas de ácidos nucleicos e proteínas purificadas por meio de métodos de purificação convencionais. O termo "purificado" também abrange ácidos nucleicos e proteínas preparados por meio de métodos de DNA recombinante em uma célula hospedeira (por exemplo, células de planta), bem como moléculas de ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos quimicamente sintetizados.

[0034] O termo "recombinante" significa uma célula ou organismo no qual recombinação genética tenha ocorrido. Ele também inclui uma molécula (por exemplo, um vetor, plasmídeo, ácido nucleico, polipeptídeo ou um pequeno RNA) que tenha sido artificial ou sinteticamente (isto é, não naturalmente) alterada por intervenção humana. A alteração pode ser realizada na molécula dentro de, ou removida de, seu ambiente ou estado natural.

[0035] Conforme usado aqui, o termo "expressão" refere-se ao processo pelo qual um polinucleotídeo é transcrito em mRNA (incluindo pequenas moléculas de RNA) e/ou o processo pelo qual o mRNA transcrito (também dito como "transcrição") é subsequentemente tra-

duzido em peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. A expressão gênica pode ser influenciada por sinais externos, por exemplo, exposição de uma célula, tecido ou organismo a um agente que aumenta ou diminui a expressão gênica. A expressão de um gene pode também ser regulada em qualquer parte da via de DNA para RNA para proteína. Regulação de expressão gênica ocorre, por exemplo, através do controle de atuação sobre a transcrição, tradução, transporte e processamento de RNA, degradação de moléculas intermediárias, tal como mRNA, ou através de ativação ou inativação, compartimentalização ou degradação de moléculas de proteína específicas após elas terem sido feitas ou por combinações dos mesmos. A expressão gênica pode ser medida ao nível do RNA ou ao nível de proteína por meio de qualquer método conhecido na técnica incluindo, sem limitação, Northern blot, RT-PCR, Western blot ou ensaio(s) de atividade de proteína *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*.

[0036] Conforme usado aqui, os termos "silenciamento de genes com base em homologia" ou "HBGS" são termos genéricos que incluem tanto silenciamento gênico transcricional quanto silenciamento gênico pós-transcricional. O silenciamento de um *locus* alvo por um *locus* de silenciamento não relacionado pode resultar de inibição de transcrição (silenciamento gênico transcricional; TGS) ou degradação de mRNA (silenciamento gênico pós-transcricional; PTGS) em virtude da produção de RNA fita dupla (dsRNA) que corresponde ao promotor ou sequências transcritas, respectivamente. Envolvimento de componentes celulares distintos em cada processo sugere que TGS e PTGS induzidos por dsRNA provavelmente resultam da diversificação de um mecanismo ancestral em comum. No entanto, uma comparação rigorosa de TGS e PTGS tem sido difícil de alcançar porque geralmente ela conta com a análise de *loci* de silenciamento distintos. Um único *locus* transgênico pode ser descrito como desencadeando tanto TGS

quanto PTGS em virtude da produção de dsRNA correspondendo ao promotor e sequências transcritas de diferentes genes-alvo.

[0037] Conforme usado aqui, os termos "molécula de ácido nucleico", "ácido nucleico" ou "polinucleotídeo" (todos os três termos são sinônimos entre si) referem-se a uma forma polimérica de nucleotídeos, a qual pode incluir fitas senso e antissenso de RNA, cDNA, DNA genômico e formas sintéticas e polímeros mistos dos mesmos. "Um nucleotídeo" pode referir-se a um ribonucleotídeo, desoxirribonucleotídeo ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. Uma molécula de ácido nucleico tem geralmente pelo menos 10 bases de comprimento, a menos que especificado de outra forma. Os termos podem referir-se a uma molécula de RNA ou DNA de comprimento indeterminado. Os termos incluem formas de fita simples e dupla de DNA. Uma molécula de ácido nucleico pode incluir tanto nucleotídeos que ocorrem naturalmente quanto modificados, ligados entre si por ligações nucleotídicas que ocorrem naturalmente e/ou que não ocorrem naturalmente.

[0038] As moléculas de ácido nucleico podem ser modificadas química ou bioquimicamente ou podem conter bases de nucleotídeo não naturais ou derivatizadas, conforme será prontamente apreciado por aqueles versados na técnica. Tais modificações incluem, por exemplo, marcadores, metilação, substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente por um análogo, modificações internucleotídeos (por exemplo, ligações não carregadas: por exemplo, metil fosfatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; ligações carregadas: por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; grupos pendentes: por exemplo, peptídeos; intercaladores: por exemplo, acridina, psoraleno, etc.; queladores; alquiladores e ligações modificadas: por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). O termo "molécula de ácido nucleico" também inclui qualquer conformação topológica, incluindo conformações fita simples, fita dupla, parcialmente

[0039] A transcrição procede de uma maneira 5' para 3' ao longo de uma fita de DNA. Isto significa que o RNA é feito através da adição sequencial de ribonucleotídeo-5'-trifosfatos ao término 3' da cadeia em crescimento (com uma eliminação requerida do pirofosfato). Em uma molécula de ácido nucleico circular ou linear, elementos distintos (por exemplo, sequências nucleotídicas específicas) podem ser ditos como estando "a jusante" em relação a outro elemento se eles estão ligados ou poderiam ser ligados ao mesmo ácido nucleico na direção 5' daquele elemento. Similarmente, elementos distintos podem estar "a jusante" em relação a outro elemento se eles estão ou poderiam ser ligados ao mesmo ácido nucleico na direção 3' a partir desse elemento.

[0040] Conforme usado aqui, o termo "posição de base" refere-se à localização de uma determinada base ou resíduo de nucleotídeo dentro de um ácido nucleico designado. Um ácido nucleico designado pode ser definido por alinhamento com um ácido nucleico de referência.

[0041] Conforme usado aqui, o termo "hibridização" refere-se a um processo onde oligonucleotídeos e seus análogos hibridizam através de ligação de hidrogênio, a qual inclui ligação de hidrogênio de Watson-Crick, Hoogsteen ou Hoogsteen invertida entre bases complementares. Em geral, moléculas de ácidos nucleicos consistem em bases nitrogenadas que são pirimidinas (citosina (C), uracila (U) e timina (T)) ou purinas (adenina (A) e guanina (G)). Estas bases nitrogenadas formam ligações de hidrogênio entre uma pirimidina e uma purina e a ligação de uma pirimidina a uma purina é dita como "emparelhamento de base". Mais especificamente, A se ligará, através de hidrogênio, a T ou U e L se ligará a C. "Complementar" refere-se ao emparelhamento de bases que ocorre entre duas sequências de ácidos nucleicos distintas ou duas regiões distintas da mesma sequência de ácido nucleico.

[0042] Conforme usado aqui, os termos "especificamente hibridáveis" e "especificamente complementares" referem-se a um grau

suficiente de complementaridade, de modo que ligação estável e específica ocorra entre um oligonucleotídeo e o DNA ou RNA alvo. Os oligonucleotídeos não precisam ser 100% complementares à sua sequência alvo para hibridizar especificamente. Um oligonucleotídeo é especificamente hibridizável quando ligação do oligonucleotídeo à molécula de DNA ou RNA alvo interfere com a função normal do DNA ou RNA alvo e não há grau suficiente de complementaridade para evitar ligação inespecífica de um oligonucleotídeo às sequências não alvo sob condições onde ligação específica é desejada, por exemplo, sob condições fisiológicas, no caso de ensaios ou sistemas *in vivo*. Tal ligação é dita como hibridização específica. Condições de hibridização resultam, em particular, dos graus de rigor, variando em função da natureza do método de hibridização escolhido e da composição e comprimento das sequências de ácidos nucleicos que hibridizam. Geralmente, a temperatura de hibridização e intensidade iônica (especialmente concentração de Na⁺ e/ou Mg²⁺) de um tampão de hibridização contribuirão para o rigor da hibridização, embora os tempos de lavagem também influenciem o rigor. Os cálculos relativos às condições de hibridização necessárias para atingir graus de rigor particulares são discutidos em Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed, vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

[0043] Conforme usado aqui, o termo "condições rigorosas" abrange condições sob as quais hibridização ocorrerá apenas se houver menos de 50% de incompatibilidade entre a molécula de hibridização e o DNA alvo. "Condições rigorosas" incluem ainda níveis de rigor particulares. Assim, conforme usado aqui, condições de "rigor moderado" são aquelas sob as quais moléculas com mais de 50% de incompatibilidade de sequência não hibridizarão; condições de "rigor elevado" são aquelas sob as quais sequências com mais de 20% de

incompatibilidade não hibridizarão; e condições de "rigor muito alto" são aquelas sob as quais sequências com mais de 10% de incompatibilidade não hibridizarão. Em modalidades particulares, condições rigorosas podem incluir hibridização a 65 °C, seguido por lavagens a 65 °C com 0,1 x SSC/SDS a 0,1% durante 40 minutos. Os seguintes são condições de hibridização representativas não limitativas:

[0044] • Rigor muito alto: hibridização em 5x tampão de SSC a 65 °C durante 16 horas; lavagem 2x em tampão de SSC em temperatura ambiente durante 15 minutos cada; e lavagem duas vezes em 0,5x tampão de SSC a 65 °C durante 20 minutos cada.

[0045] • Rigor elevado: hibridização em 5-6x tampão de SSC a 65-70 °C durante 16-20 horas; lavagem duas vezes em 2x tampão de SSC em temperatura ambiente durante 5-20 minutos cada; e lavagem duas vezes em 1x tampão de SSC a 55-70 °C durante 30 minutos cada.

[0046] • Rigor moderado: hibridização em 6x tampão de SSC em temperatura ambiente a 55 °C durante 16-20 horas; lavagem pelo menos duas vezes em 2x-3x tampão de SSC em temperatura ambiente a 55 °C durante 20-30 minutos cada.

[0047] Em uma modalidade, moléculas de ácido nucleico especificamente hibridizáveis podem permanecer ligadas sob condições de hibridização de rigor muito elevado. Em uma modalidade, moléculas de ácido nucleico especificamente hibridizáveis podem permanecer associadas sob condições de hibridização de rigor elevado. Em uma modalidade, moléculas de ácido nucleico especificamente hibridizáveis podem permanecer associadas sob condições de hibridização de rigor moderado.

[0048] Conforme usado aqui, o termo "oligonucleotídeo" refere-se a um polímero de ácido nucleico curto. Os oligonucleotídeos podem ser formados por clivagem de segmentos de ácido nucleico mais lon-

gos ou por polimerização de precursores de nucleotídeos individuais. Sintetizadores automáticos permitem a síntese de oligonucleotídeos de até várias centenas de pares de bases de comprimento. Uma vez que os oligonucleotídeos podem se ligar a uma sequência de nucleotídeos complementar, eles podem ser usados como sondas para detecção de DNA ou RNA. Oligonucleotídeos compostos por DNA (oligodesoxirribonucleotídeos) podem ser usados em PCR, uma técnica para amplificação de sequências de DNA pequenos. Em PCR, um oligonucleotídeo é, tipicamente, dito como um "iniciador", o qual permite que uma DNA polimerase estenda o oligonucleotídeo e reproduza a fita complementar.

[0049] Conforme usado aqui, os termos "reação em cadeia de polimerase" ou "PCR" definem um procedimento ou técnica em que quantidades diminutas de ácido nucleico, RNA e/ou DNA são amplificadas, conforme descrito na Patente dos Estados Unidos N° 4.683.195, depositada em 28 de Julho de 1987. Em geral, informação de sequência a partir das extremidades da região de interesse ou além precisa estar disponível para que iniciadores de oligonucleotídeos possam ser concebidos; estes iniciadores serão idênticos ou similares, quanto à sequência, às fitas opostas do modelo a ser amplificado. Os nucleotídeos 5'terminais dos dois iniciadores podem coincidir com as extremidades do material amplificado. PCR pode ser usada para amplificar sequências de RNA específicas, sequências de DNA específicas a partir de DNA genômico total e cDNA transcrita a partir de sequências de RNA celular total, sequências de bacteriófagos ou plasmídeos, etc. Vide, em geral, Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).

[0050] Conforme usado aqui, o termo "iniciador" refere-se a um oligonucleotídeo capaz de atuar como um ponto inicial para síntese ao

longo de uma fita complementar quando as condições são adequadas para síntese de um produto de extensão do iniciador. As condições de síntese incluem a presença de quatro trifosfatos de desoxirribonucleotídeo diferentes e pelo menos um agente indutor de polimerização, tal como transcriptase inversa ou DNA polimerase. Estes estão presentes em um tampão adequado, o qual pode incluir componentes os quais são cofatores ou os quais afetam condições, tal como o pH e similares, em várias temperaturas adequadas. Um iniciador é, de preferência, uma sequência fita simples, de modo que a eficiência de amplificação seja otimizada, mas sequências de fita dupla podem ser usadas.

[0051] Conforme usado aqui, o termo "sonda" refere-se a um oligonucleotídeo que hibridiza a uma sequência alvo. No procedimento de ensaio TaqMan® ou TaqMan®-style, a sonda hibridiza a uma porção do alvo situada entre o sítio de hibridação dos dois iniciadores. A sonda inclui cerca de oito nucleotídeos, cerca de dez nucleotídeos, cerca de quinze nucleotídeos, cerca de vinte nucleotídeos, cerca de trinta nucleotídeos, cerca de quarenta nucleotídeos ou cerca de cinquenta nucleotídeos. Em algumas modalidades, uma sonda inclui de cerca de oito nucleotídeos a cerca de quinze nucleotídeos.

[0052] No procedimento de ensaio Southern blot, a sonda hibridiza com um fragmento de DNA que está ligado a uma membrana. A sonda inclui cerca de dez nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, cerca de 250 nucleotídeos, cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 1000 nucleotídeos, cerca de 2500 nucleotídeos, ou cerca de 5000 nucleotídeos. Em algumas modalidades, uma sonda inclui de cerca de 500 nucleotídeos a cerca de 2.500 nucleotídeos.

[0053] Uma sonda pode ainda incluir um marcador detectável, tal como, um marcador radioativo, um marcador biotinilado, um fluoroforo (Texas-RED®, isotiocianato de fluoresceína, etc.). O marcador detectável pode ser covalentemente ligado diretamente ao oligonucleotídeo

da sonda, por exemplo, de modo tal que o marcador esteja localizado na extremidade 5' ou na extremidade 3' da sonda. Uma sonda compreendendo um fluoroforo pode também incluir adicionalmente um dissipador (por exemplo, Black Hole QuencherTM, Iowa BlackTM, etc.).

[0054] Conforme usado aqui, os termos "identidade de sequência" ou "identidade" podem ser usados alternadamente e referem-se aos resíduos de ácido nucleico em duas sequências que são os mesmos quando alinhadas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação especificada.

[0055] Conforme usado aqui, o termo "percentagem de identidade de sequência" refere-se a um valor determinado por comparação de duas sequências otimamente alinhadas (por exemplo, sequências de ácidos nucleicos ou sequências de aminoácidos) sobre uma janela de comparação, em que a porção de uma sequência na janela de comparação pode compreender adições ou exclusões (isto é, lacunas) quando comparado com uma sequência de referência (que não compreende adições ou exclusões) para alinhamento ótimo das duas sequências. A percentagem é calculada determinando-se o número de posições nas quais um resíduo de ácido nucleico ou aminoácido idêntico ocorre em ambas as sequências para obter o número de posições coincidentes, dividindo-se o número de posições coincidentes pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando-se o resultado por 100 para dar a percentagem de identidade de sequência. Métodos para alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos. Vários programas e algoritmos de alinhamento são descritos, por exemplo, em: Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482; Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443; Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444; Higgins e Sharp (1988) *Gene* 73: 237-44; Higgins e Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151-3; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 10881-90; Huang *et al.*

(1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8: 155-65; Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-31; Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 247-50.

[0056] O National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10) está disponível a partir de várias fontes, incluindo o National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD) e na internet para uso juntamente com diversos programas de análise de sequência. Uma descrição de como determinar a identidade de sequência usando este programa está disponível na internet na seção "ajuda" para o BLAST™. Para comparações de sequências de ácidos nucleicos, a função de "Blast 2 sequences" do programa BLAST™ (Blastn) pode ser empregada usando os parâmetros convencionais. Sequências de ácidos nucleicos com similaridade ainda maior com sequências de referência mostrarão identidade percentual de sequência maior quando avaliadas por este método.

[0057] Conforme usado aqui, o termo "operativamente ligado" refere-se a um ácido nucleico colocado em uma relação funcional com outro ácido nucleico. Geralmente, "operativamente ligado" pode significar que os ácidos nucleicos ligados são contíguos. Ligação pode ser conseguida por ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, adaptadores ou ligantes oligonucleotídicos sintéticos são usados de acordo com a prática convencional. No entanto, os elementos não precisam ser contíguos para estarem operativamente ligados.

[0058] Conforme usado aqui, o termo "promotor" refere-se a uma região de DNA que está geralmente localizada a montante de um gene (isto é, em direção à extremidade 5' de um gene) e é necessária para iniciar e dirigir a transcrição do gene. Um promotor pode permitir a ativação ou repressão apropriada de um gene que ele controla. Um promotor pode conter sequências específicas que são reconhecidas por

fatores de transcrição. Estes fatores podem se ligar a uma sequência de DNA do promotor, resultando em recrutamento de RNA polimerase, uma enzima que sintetiza RNA a partir da região de codificação do gene. O promotor refere-se, em geral, a todos os elementos reguladores do gene localizados a montante do gene, incluindo 5'-UTRs, íntrons, e sequências líderes.

[0059] Conforme usado aqui, o termo "promotor a montante" refere-se a uma sequência de polinucleotídeo contígua que é suficiente para início direto de transcrição. Conforme usado aqui, um promotor a montante abrange o sítio de iniciação de transcrição com vários motivos de sequências, os quais incluem uma caixa TATA, sequência iniciadora (Inr), elementos de reconhecimento TFIIB (BRE) e outros motivos de promotor (Jennifer, E.F. et al, (2002) *Genes & Dev.*, 16: 2583-2592). O promotor a montante fornece o sítio de ação para RNA polimerase II, uma enzima de múltiplas subunidades com os fatores de transcrição de base ou gerais, tais como TFIIA, B, D, E, F e H. Estes fatores se estruturam em um complexo de pré-início de (Pre-Initiation Complex - PIC) que catalisa a síntese de RNA a partir de um modelo de DNA.

[0060] A ativação do promotor a montante é realizada por meio da adição de elementos de sequência de DNA reguladores aos quais várias proteínas se ligam e, subsequentemente, interagem com o complexo de início de transcrição para ativar a expressão do gene. Estas sequências de elemento regulador gênico interagem com fatores de ligação a DNA específicos. Estes motivos de sequência podem, algumas vezes, ser ditos como *cis* elementos. Tais *cis*-elementos, aos quais fatores de transcrição desenvolvimento específicos ou tecidos específicos se ligam, individualmente ou em combinação, podem determinar o padrão de expressão espaço-temporal de um promotor ao nível de transcrição. Estes *cis* elementos variam muito quanto ao tipo

de controle que eles exercem sobre genes operativamente ligados. Alguns elementos atuam para aumentar a transcrição de genes operativamente ligados em resposta às condições ambientais (por exemplo, temperatura, umidade e ferimento). Outros *cis*-elementos podem responder a estímulos de desenvolvimento (por exemplo, germinação, maturação de sementes e floração) ou à informação espacial (por exemplo, especificidade tecidual). Vide, por exemplo, Langridge *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3219-23. Estes *cis* elementos estão localizados em uma distância que varia a partir do ponto de início de transcrição. Alguns *cis* elementos (denominados elementos proximais) estão adjacentes a uma região promotora central mínima, enquanto outros elementos podem estar posicionados várias quilobases 5' a montante ou 3' a jusante do promotor (intensificadores).

[0061] Conforme usado aqui, o termo "transformação" abrange todas as técnicas pelas quais uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida em tal célula. Exemplos incluem, porém sem limitações: transfecção com vetores virais; transformação com vetores de plasmídeos; eletroporação; lipofecção; microinjeção (Mueller *et al* (1978) *Cell* 15: 579-85); transferência mediada por *Agrobacterium*; absorção direta de DNA; transformação mediada por WHISKERS™; e bombardeamento de microprojéteis. Estas técnicas podem ser usadas tanto para transformação estável quanto expressão transitória de uma célula de planta. "Transformação estável" refere-se à introdução de um fragmento de ácido nucleico em um genoma de um organismo hospedeiro, resultando em herança geneticamente estável. Uma vez estavelmente transformados, o fragmento de ácido nucleico é estavelmente integrado no genoma do organismo hospedeiro e qualquer geração subsequente. Organismos hospedeiros contendo os fragmentos de ácido nucleico transformados são ditos como organismos "transgênicos". "Transformação transitória" refere-se à introdução de um frag-

mento de ácido nucleico no núcleo ou organela que contém DNA de um organismo hospedeiro, resultando em expressão gênica sem herança geneticamente estável.

[0062] Conforme usado aqui, o termo "transdução" refere-se a um processo onde um vírus transfere ácido nucleico para uma célula.

[0063] Conforme usado aqui, o termo "transgene" refere-se a uma sequência de ácido nucleico exógena. Em um exemplo, um transgene é uma sequência gênica (por exemplo, um gene de resistência ao herbicida), um gene que codifica um composto industrial ou farmaceuticamente útil ou um gene que codifica um traço agrícola desejável. Em ainda outro exemplo, um transgene é uma sequência de ácido nucleico antissenso, em que expressão da sequência de ácido nucleico antissenso inibe a expressão de uma sequência de ácido nucleico alvo. Um transgene pode conter sequências reguladoras operativamente ligadas ao transgene (por exemplo, um promotor, ítron, 5'-UTR ou 3'-UTR). Em algumas modalidades, um ácido nucleico de interesse é um transgene. No entanto, em outras modalidades, um ácido nucleico de interesse é um ácido nucleico endógeno, em que cópias genômicas adicionais de ácido nucleico endógeno são desejadas ou um ácido nucleico que está na orientação antissenso em relação à sequência de um ácido nucleico alvo em um organismo hospedeiro.

[0064] Conforme usado aqui, o termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico quando introduzida em uma célula, deste modo, produzindo uma célula transformada. Um vetor pode incluir sequências de ácido nucleico que permitem sua replicação na célula hospedeira, tal como uma origem de replicação. Exemplos incluem, porém sem limitações, um plasmídeo, cosmídeo, bacteriófago, cromossoma artificial bacteriano (BAC) ou vírus que transporta o DNA exógeno para uma célula. Um vetor pode também incluir um ou mais genes, moléculas antissenso e/ou genes marcadores selecionáveis e

outros elementos genéticos conhecidos na técnica. Um vetor pode transduzir, transformar ou infectar uma célula, assim, fazendo com que a célula expresse as moléculas de ácido nucleico e/ou proteínas codificadas pelo vetor. Um vetor pode incluir opcionalmente materiais para auxiliar na obtenção de entrada da molécula de ácido nucleico na célula (por exemplo, um lipossoma).

[0065] Conforme usado aqui, os termos "cassete", "cassete de expressão" e "cassete de expressão gênica" referem-se a um segmento de DNA que pode ser inserido dentro de um ácido nucleico ou polinucleotídeo em sítios de restrição específicos ou por recombinação homóloga. Um segmento de DNA compreende um polinucleotídeo contendo um gene de interesse que codifica um pequeno RNA ou um polipeptídeo de interesse e o cassete e sítios de restrição são concebidos para assegurar inserção do cassete no quadro de leitura apropriado para transcrição e tradução. Em uma modalidade, um cassete de expressão pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse e que tem elementos, além do polinucleotídeo, que facilitam a transformação de uma célula hospedeira particular. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica pode também incluir elementos que permitem expressão aprimorada de um pequeno RNA ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse em uma célula hospedeira. Estes elementos podem incluir, porém sem limitações: um promotor, um promotor mínimo, um intensificador, um elemento de resposta, um ítron, um 5'-UTR, UM 3'-UTR, uma sequência terminadora, uma sequência de poliadenilação e similares.

[0066] Conforme usado aqui, o termo "sequência de codificação heteróloga" é usado para indicar qualquer polinucleotídeo que codifica ou, finalmente codifica, um peptídeo ou uma proteína ou sua sequência de aminoácidos equivalente, por exemplo, uma enzima, que não está normalmente presente no organismo hospedeiro e pode ser ex-

presso na célula hospedeira sob condições adequadas. Como tal, "sequências de codificação heterólogas" podem incluir uma ou cópias adicionais de sequências de codificação que não estão normalmente presentes na célula hospedeira, de modo que a célula expressa cópias adicionais de uma sequência de codificação que não está normalmente presente nas células. As sequências de codificação heterólogas podem ser RNA ou qualquer tipo do mesmo (por exemplo, mRNA), DNA ou qualquer tipo do mesmo (por exemplo, cDNA) ou um híbrido de RNA/DNA. Exemplos de sequências de codificação incluem, porém sem limitações, unidades de transcrição de comprimento total que compreendem características tais como a sequência de codificação, íntrons, regiões promotoras, 5'-UTR, 3'-UTR e regiões intensificadoras.

[0067] "Sequências de codificação heterólogas" também incluem a porção codificadora do peptídeo ou enzima (isto é, a sequência de cDNA ou mRNA), a porção de codificação da unidade de transcrição de comprimento total (isto é, o gene que compreende íntrons e exons), sequências "códons otimizadas", sequências truncadas ou outras formas de sequências alteradas que codificam a enzima ou codificam sua sequência de aminoácidos equivalente, contanto que a sequência de aminoácidos produza uma proteína funcional. Tais sequências de aminoácidos equivalentes podem ter uma exclusão de um ou mais aminoácidos, com a exclusão sendo N-terminal, C-terminal ou interna. Formas truncadas são previstas, contanto que elas tenham a capacidade catalítica indicada aqui.

[0068] Conforme usado aqui, o termo "controle" refere-se a uma amostra usada em um procedimento analítico para fins de comparação. Um controle pode ser "positivo" ou "negativo". Por exemplo, onde a finalidade é um procedimento analítico para detectar um transcrito ou polipeptídeo diferencialmente expresso em células ou tecidos, geralmente é preferível incluir um controle positivo, tal como uma amostra

de uma planta conhecida por exibir a expressão desejada, e um controle negativo, tal como uma amostra de uma planta conhecida por carecer da expressão desejada.

[0069] Conforme usado aqui, o termo "planta" inclui plantas e partes de uma planta incluindo, porém sem limitações, células de plantas e tecidos de plantas, tais como folhas, calos, caules, raízes, flores, pólen e sementes. A classe de plantas que pode ser usada na presente invenção é geralmente tão ampla quanto a classe de plantas superiores e inferiores passíveis de mutagênese, incluindo angiospérmicas, gimnospérmicas, samambaias e algas multicelulares. Assim, "planta" inclui plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Exemplos de plantas dicotiledôneas incluem tabaco, *Arabidopsis*, soja, tomate, papaia, canola, girassol, algodão, alfafa, batata, videira, ervilha de Angola, ervilha, *Brassica*, grão de bico, beterraba sacarínica, colza, melancia, melão, pimenta, amendoim, abóbora, rabanete, espinafre, abóbora, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, couve Chinesa, pepino, berinjela e alface. Exemplos de plantas monocotiledôneas incluem milho, arroz, trigo, cana de açúcar, cevada, centeio, sorgo, orquídeas, bambu, banana, taboa, lírios, aveia, cebola, milho, trigo e triticale.

[0070] Conforme usado aqui, o termo "material de planta" refere-se à folhas, calos, caules, raízes, flores ou partes de flores, frutos, pólen, células ovo, zigotos, sementes, estacas, culturas de células ou tecidos ou qualquer outra parte ou produtos de uma planta. Em uma modalidade, o material da planta inclui cotilédone e folha. Em uma modalidade, o material de planta inclui tecidos da raiz ou outros tecidos vegetais localizados no subsolo.

[0071] Conforme usado aqui, o termo "gene marcador selecionável" refere-se a um gene que é opcionalmente usado na transformação de plantas, por exemplo, para proteger as células de plantas contra um agente seletivo ou conferir resistência/tolerância a um agente seletivo.

Além disso, um "gene marcador selecionável" abrange genes repórter. Apenas células ou plantas que recebem um marcador selecionável funcional são capazes de divisão ou cultura sob condições que têm um agente seletivo. Exemplos de agentes seletivos podem incluir, por exemplo, antibióticos, incluindo espechinomicina, neomicina, canamicina, paramomicina, gentamicina e higromicina. Estes marcadores selecionáveis incluem fosfotransferase de neomicina (npt II), que expressa uma enzima que confere resistência ao antibiótico canamicina, e os genes para os antibióticos relacionados neomicina, paromomicina, gentamicina e G418 ou o gene de fosfotransferase de higromicina (HPT), que expressa uma enzima que confere resistência à higromicina. Outros genes marcadores selecionáveis podem incluir genes que codificam resistência a herbicidas, incluindo *bar* ou *pat* (resistência contra glufosinato de amônio ou fosfinotricina), sintase de acetolactato (ALS, resistência contra inibidores, tais como sulfoniluréias (SUs), imidazolinonas (IMIs), triazolopirimidinas (TPs), oxibenzoatos de pirimidina (POBs) e sulfonilamino carbonil triazolinonas, que impedem a primeira etapa na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada), glifosato, 2,4-D e resistência ou sensibilidade a metal. Exemplos de genes "repórter" que podem ser usados como um gene marcador selecionável incluem a observação visual de proteínas de gene repórter expressas como proteínas que codificam β-glucuronidase (GUS), luciferase, proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein - GFP), proteína fluorescente amarela (Yellow Fluorescent Protein - YFP), DsRed, β-galactosidase, acetiltransferase de cloranfenicol (CAT), fosfatase alcalina e similares. A expressão "marcador positivo" refere-se às plantas que foram transformadas para incluir um gene marcador selecionável.

[0072] Conforme usado aqui, o termo "marcador detectável" refere-se a um marcador capaz de detecção tal como, por exemplo, um isótopo radioativo, composto fluorescente, composto bioluminescente,

um composto quimioluminescente, quelador de metal ou enzima. Exemplos de marcadores detectáveis incluem, porém sem limitações, os seguintes: marcadores fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, substâncias fosforescentes de lantanídeos), marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), substâncias quimioluminescentes, grupos biotinila, epitópos polipeptídicos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de pares de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação a metal, rótulos de epitópo). Em uma modalidade, um marcador detectável pode ser ligado por meio de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o potencial de impedimento espacial.

[0073] Conforme usado aqui, o termo "detecção" é usado no sentido mais lato para incluir tanto medições qualitativas quanto quantitativas de uma molécula específica, por exemplo, medições de um polipeptídeo específico.

[0074] A menos que de outra forma especificamente explicado, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme normalmente entendido por aqueles versados na técnica à qual a presente descrição pertence. Definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas, por exemplo, em: Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994 ; Kendrew *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltda., 1994 ; e Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995.

Promotores Como Elementos Reguladores de Expressão Gênica

[0075] Promotores de plantas usados para aplicações de pesquisa básica ou biotecnológicas são geralmente unidireccionais, comandando a expressão constitutiva de um transgene que foi fundido à sua extremidade 3' (a jusante). Muitas vezes, é necessário expressar de forma

robusta transgenes dentro plantas para engenharia metabólica e empilhamento de traços. Além disso, vários novos promotores são normalmente necessários em culturas transgênicas para comandar a expressão de múltiplos genes. É descrito aqui um promotor constitutivo que pode dirigir a expressão de um transgene que tenha sido fundido em sua extremidade 3'.

[0076] O desenvolvimento de produtos transgênicos está se tornando cada vez mais complexo, o que requer expressão robusta de transgenes e empilhamento de vários transgenes em um único *locus*. Tradicionalmente, cada um transgene requer um único promotor para expressão, em que múltiplos promotores são necessários para expressar diferentes transgenes dentro de uma pilha de genes. Com um tamanho crescente de pilhas de genes, este método frequentemente leva ao uso repetido do mesmo promotor para obter níveis similares de diferentes padrões de expressão de diferentes transgenes para expressão de um único traço poligênico.

[0077] Construtos com múltiplos genes comandados pelo mesmo promotor são conhecidos por causar silenciamento do gene, resultando em produtos transgênicos menos eficazes no campo. O excesso de sítios de ligação a fator de transcrição (Transcription Factor - TF) em virtude de repetição de promotores pode causar depleção de TFs endógenos, levando à inativação transcricional. É provável que o silenciamento de transgenes afete indesejavelmente o desempenho de uma planta transgênica produzida para expressar transgenes. Sequências repetitivas dentro de um transgene podem levar à recombinação homóloga *intra locus* gênico, resultando em rearranjos de polinucleotídeos.

[0078] Além de promotores constitutivos, promotores tecido específicos ou órgãos específicos comandam a expressão gênica em determinados tecidos, tais como no núcleo, raiz, folha, caule, pólen ou

tapete da planta. Promotores tecido e estágios de desenvolvimento específicos comandam a expressão de genes que são expressos em tecidos particulares ou em determinados períodos de tempo durante o desenvolvimento da planta. Promotores tecido específicos são necessários para determinadas aplicações na indústria de plantas transgênicas e são desejáveis, uma vez que permitem a expressão específica de genes heterólogos em um tecido e/ou em estágios de desenvolvimento selecionados, indicando expressão do gene heterólogo diferencialmente em vários órgãos, tecidos e/ou em diferentes momentos, mas não outros.

[0079] Por exemplo, aumento da resistência de uma planta à infecção por patógenos provenientes do solo pode ser obtida por meio de transformação do genoma de uma planta com um gene de resistência ao patógeno, de modo que uma proteína de resistência ao patógeno seja expressa de forma robusta dentro da planta. Alternativamente, pode ser desejável expressar um transgene em tecidos de plantas que se encontram em um estágio de crescimento ou desenvolvimento particular tais como, por exemplo, divisão celular ou alongamento. Outra aplicação é a conveniência do uso de promotores tecido específicos, de modo que os promotores limitariam a expressão de transgenes que codificam um traço agronômico no desenvolvimento de partes da planta (isto é, raízes, folhas, caules, ou pólen).

[0080] Os promotores descritos aqui são ferramentas promissoras para fazer construtos transgênicos comerciais contendo vários genes. Estes promotores também conferem estabilidade estrutural em hospedeiros bacterianos e estabilidade funcional em células vegetais, tal como redução de silenciamento do transgene, para permitir expressão do transgene. Promotores com diferentes faixas de expressão também podem ser obtidos empregando os métodos descritos aqui. Em comparação com construtos de transgenes que usam um único promotor

várias vezes, os construtos de promotor diversificados descritos no presente pedido são mais compatíveis para análises moleculares a jusante de eventos transgênicos. Uso dos promotores diversificados descritos aqui também aliviar rearranjos em múltiplos *loci* transgênicos durante objetivação com a tecnologia de dedo de zinco (SHUKLA et al., 2009).

Promotores de Ubiquitina-1 de Zea mays e Zea luxurians

[0081] O promotor Ubi-1 de *Zea mays* tem sido um padrão na indústria de biotecnologia, usado predominantemente para alta expressão transgênica estável em milho (CHRISTENSEN e QUAIL 1996; CHRISTENSEN et al. 1992; TOKI et al. 1992). Cada transgene geralmente requer um promotor específico para expressão suficiente. Vários promotores são, tipicamente, necessários para expressar diferentes transgenes dentro de uma pilha de genes. Este paradigma frequentemente leva ao uso repetitivo do promotor Ubi-1 de *Z. mays* em virtude de seus altos níveis de expressão de proteína e padrão de expressão constitutiva desejados.

[0082] No entanto, a introdução deliberada de sequências repetitivas em um *locus* transgênico também pode levar a efeitos negativos indesejáveis sobre a expressão e a estabilidade do transgene ((FLADUNG e KUMAR 2002; KUMAR e FLADUNG 2000a; KUMAR e FLADUNG 2000b; KUMAR e FLADUNG 2001a; KUMAR e FLADUNG 2001b; KUMAR e FLADUNG 2002; METTE et al. 1999; MOURRAIN et al. 2007). O desafio de múltipla expressão de transgene coordenada pode ser abordada usando uma abordagem de diversidade de promotor, onde diferentes promotores são usados para comandar diferentes transgenes com o mesmo perfil de expressão (PEREMARTI et al. 2010). O presente pedido descreve uma sequência de promotor Ubi-1 diversificada obtida através da identificação e purificação do novo promotor a partir de diferentes espécies *Zea*.

[0083] Início de transcrição e modulação de expressão gênica em genes de plantas são comandados por uma variedade de elementos de sequência de DNA coletivamente dispostos em uma sequência maior denominada um promotor. Promotores eucariotas consistem, tipicamente, em um promotor central mínimo e sequências reguladoras a montante. O promotor central é um trecho mínimo de sequência de DNA contígua que é suficiente para comandar o início de transcrição preciso. Promotores centrais em plantas geralmente compreendem regiões canônicas associadas ao início de transcrição, tais como caixas CAAT e TATA (sequência de consenso TATAWAW). O elemento da caixa TATA usualmente está localizado aproximadamente 20 a 35 pares de bases (pb) a montante do sítio de início de transcrição (Transcription Start Site - TSS). A ativação do promotor central é realizada por sequências reguladoras a montante às quais se ligam várias proteínas e, subsequentemente, interagem com o complexo de início de transcrição para ativar a expressão gênica. Estes elementos reguladores compreendem sequências de DNA que determinam o padrão de expressão espacial e temporal de um promotor.

[0084] Fazendo referência à Figura 1, o promotor do gene Ubi-1 de *Z. mays* é derivado da linhagem de células endógama B73 de *Z. mays*. O promotor Ubi-1 de *Z. mays* é compreendido de aproximadamente 895 pb de sequência de DNA localizada 5' a montante do TSS (isto é, o elemento a montante). Além disso, o promotor Ubi-1 de *Z. mays* é compreendido de cerca de 1093 pb de sequência de DNA localizada 3' a jusante do TSS (vide Patente dos Estados Unidos N° 5.510.474). Assim, o promotor Ubi-1 de *Z. mays* é compreendido de aproximadamente 2 pares de kilo bases (kb) de sequência de DNA total.

[0085] O elemento a montante do promotor Ubi-1 de *Z. mays* compreende uma caixa TATA localizada aproximadamente 30 pb 5' a

montante do TSS (Figuras 1 e 3). Além disso, o elemento a montante compreende dois elementos de consenso de choque térmico que se sobrepõem localizados imediatamente 5' a montante do TSS. Uma 5'-UTR de 82 pb ou sequência líder está localizada imediatamente 3' a jusante do TSS e é seguida por um ítron que se estende da base 83 até 1093 (Figuras 1 e 3).

[0086] Os trabalhos anteriores descreveram expressão gênica aumentada de genes e/ou transgenes regulados pelo promotor Ubi-1 de *Z. mays*. Por exemplo, a fusão de transcrição do gene de acetil-transferase de cloranfenicol (Chloramphenicol AcetylTransferase - CAT) para o promotor Ubi-1 de *Z. mays* produziu um nível mais de 10 vezes maior de atividade de CAT em protoplastos de milho do que a expressão comandada pelo promotor do vírus mosaico da couve-flor 35S ((CHRISTENSEN e QUAIL 1996; CHRISTENSEN *et al.* 1992)).

[0087] Além do promotor Ubi-1 de *Z. mays* de controle, o presente pedido descreve um novo promotor Ubi-1 de milho. Ao contrário do promotor Ubi-1 derivado do genótipo c.v. B73 de *Z. mays* de controle, o novo promotor Ubi-1 foi derivado de uma espécie *Zea* diferente, *Zea luxurians*. O promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* usado aqui tinha o genótipo de versão 1 (v1). São fornecidos construtos e métodos que usam um promotor Ubi-1 de *Z. mays* ou *Z. luxurians* compreendendo uma sequência de polinucleotídeos. Em uma modalidade, um promotor pode de compreender uma sequência de polinucleotídeos de um gene de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como segue:

```
GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
TAAGTTATAAAAATTACCACTATTTTTTGTACACTGTTGAAGTGCAGTT
TATCTATCTTATACATATTTAACTTACTCTACGAATAATAATCTATAGTA
CTACAATAATATCAGTGTAGAGAATCATATAATGAACAGTTAGACATGGTC
TAAAGGACAATTGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTATCTTTTAGTG
TGCATGTGTTCTCCTTTTTGCAAATAGCTCACCTATATAACTTCATCCA
TTTATTAGTACATCCATTAGGGTTAGGGTTAATGGTTTATAGACTAATTT
TTTAGTACATCTATTTATTCTATTTAGCCTCTAAATTAAGAAAAACTAAACTCT
ATTTAGTTTTTATTAATAGTTAGATATAAAATAGAATAAAAATAAGTGACTA
AAAATTAAACAAATACCCTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTCTTG
TTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACA
```

CCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAACGACAGGGCAC
 GGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTG
 GACTTGCTCCGCTGCGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTG
 AGCCGGCACGGCAGGCAGGCCTCCTCCTCCTCACGGCACCGGCAGCTACG
 GGGGATTCCCTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCCTCGCCCCGCCGTAATA
 AATAGACACCCCCCTCCACACCCCTTTCCCCAACCTCGTGGTCTGGAGCGC
 ACACACACACAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCA
 AGGTACGCCGCTCGCCTCCCCCCCCCCCCCTCTACCTCTAGATCG
 GCGTTCCGGTCCATGCATGGTTAGGGCCCGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTT
 GTGTTAGATCCGTGTTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGAT
 GCGACCTGTACGTACGACACGTTCTGATTGCTAAGTGGCAGTGTGTTCTTTG
 GGGAACTCTGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGGGATCGATTTCATGATT
 TTTTTGTTCTGATAGGGTTGGTTGCCCTTCCCTTATTCAATATATG
 CCGTGCACTTGTTGTCGGGCATCTTTCATGCTTTTTGTCTGGTTGTGA
 TGATGTGGTCTGGTGGCGGTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTCAA
 CTACCTGGTGGATTATTAAATTGGATCTGTATGTGTGCCATACATATT
 AGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATG
 TTGATGCGGGTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTGTTGCTGGTTG
 TGATGATGTGGTGTGGTGGCGGTCTAGATCGGAGTAGAA
 TACTGTTCAAACCTACCTGGTGTATTATTAAATTGGAACTGTATGTGTGTC
 ATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAG
 GTATACATGTTGATGTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGC
 ATCTATTATGCTTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAACAGTATGTT
 TTATAATTATTCGATCTTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATAT
 GTGGATTTTTAGCCCTGCCTCATACGCTATTATTGCTGGTACTGTTCT
 TTTGTCGATGCTCACCTGTTGGTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 1)

[0088] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo do gene Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 como segue:

GACCCGGTCGTGCCCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATC
 AAAAATTACACATATTGGCACACTTATTAAAGTGCAGTTATCTATCTC
 TATACACATATTAAACTTCACTTATAAATAATAGTTATAGTACTAAACTAA
 ATCAGTGTAGATAATTATAAAATGAACCGCTAGACATGGCTAAAGTACAA
 CCGAGTATTGACAACAGGACTCTACAGTTATCTTTAGTGTGCATGTGTT
 TCTCTGTTTTTTCAATAGCTTGACCTATATAACTTCATCCATTATT
 GTACATCCATTAGGGATTCAAGGGTGTGGTTCTATAGACTAATTAGTAC
 ATCTATTATTATTAAATTAAAGAAAAGTAAACTCTATTAGTT
 CTACAAATTAAACAAATACCCCTTAAGGAATTAAAAAAACTAAGGAAACATT
 CTTGTTCGAGTAGATTGACAGCCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACG
 GACACCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAACGACG
 GCACGGCATCTCTGCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACC
 GTGGACTTGCTCCGCTGCGCATCCAGAAAGTGCCTGGAGCGGAGCGGAGA
 CGTGAAGGCGGCCTCCCTCCTCACGGCACCGGAGCTACGGGGATTCC
 TTTCCCACCGCTCCGCTTCCCTCGCCCCGCCGTAATAAAATAGACACC
 CCCTCCACACCCCTTTCCCCAACCTCGTGTGTTGTTGGAGCGCACACACACA
 CAACCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTCAAGGTACGCC
 GCTCATCTCCCCCCCCCTCTACCTCTAGATCGGAATCCGGTCCATG
 GTTAGGGCCCGATAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGTTAGATCCGTGCTGCT
 AGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGACACGTTCTGATTGCTAACTT
 GCCAGTGTGTTCTTTGGCGAACATCCAGGGATGGCTAGCCGTTCCGCAGACG
 GGTCGATTTCATGATTTTTGTTGTTGTCACATAGGGTTGGTTGCCCTT

TTCCTTATTCCCTATATGCTGTACACTCTTGTGGGTCATCTGTATGCTT
 CTTTAATCTGGTGTGATGTGCTCTGGTGGATTATAATTGTATCTGTACGT
 AGTAGAATACTGTTCAAGCTACCTGGTGGATTATAATTGTATCTGTACGT
 GTGTGCCATACATCTCATAGTTACGAGTTAACATGATGGATGGAAATATCGA
 TCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCAGGTTACTGATGCATATACAGAGATG
 CTTTTTTCGCTTGTTGATGATGCCGCTGGTGGATTATAATTCTGGATCTGTA
 CGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGGATTATAATTCTGGATCTGTA
 TGTGTGCCATACATCTGATAGTTACGAGTTAACATGATGGATGGAAATAT
 CGATCTAGGATAGGTATACATGTCGATGTGGGTTACTGATGCATATACATGA
 TGGCATATGCAGCATCTATTGATATGCTAACCTGAGTACCTATCTATTATAA
 TAAACAAGTATGTTTATAATTATTTGACCTGATATACTGGATGATGGCATAT
 GCAGCAGCTATATGTGGATTTAGCCTGCCTCATACGCTATTATTGTT
 TGGGGCTGTTCTTTGTTGACGC-
 CACCTGTTGGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 2)

[0089] Os promotores descritos aqui foram caracterizados por clonagem de DNA e subsequente análise de homologia de sequência para identificar regiões específicas do promotor (isto é, regiões a montante do promotor, 5'-UTR e ítrons). São fornecidos construtos e métodos que usam um promotor Ubi-1 constitutivo de *Z. mays* ou *Z. luxurians* compreendendo sequências de polinucleotídeos da região a montante de um promotor, 5-UTR ou região líder e um ítron para expressar transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo a montante do promotor do gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como segue:

GTGCAGCGTGACCCGGTGTCCCCCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
 TAAGTTATAAAAATTACCACTATTTTTGTCACACTGTTGAAGTGCAGTT
 TATCTATCTTATACATATTTAAACTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTA
 CTACAATAATATCAGTGTGTTAGAGAACATATAAAATGAACAGTTAGACATGGTC
 TAAAGGACAATTGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTATCTTTAGTG
 TGCAATGTTCTCCTTTTGCAAATAGCTCACCTATATAACTTCATCCA
 TTTTATTAGTACATCCATTAGGGTTAGGGTTAATGGTTTATAGACTAATT
 TTTAGTACATCTATTTATTCTATTTAGCCTCTAAATTAAAGAAAACAAACTCT
 ATTTAGTTTTTATTAATAGTTAGATATAAAATAGAATAAAATAAGTACTA
 AAAATTAAACAAATACCCTTAAGAAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTCCTG
 TTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACA
 CCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC
 GGCATCTCTGCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTCCGCTCCACCGTTG
 GACTTGCTCCGCTGCGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGGAGACGTG
 AGCCGGCACGGCAGGCAGGCTCCTCCTCACGGCACCGCAGCTACG
 GGGGATTCCCTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCCGCCGTAATA
 AATAGACACCCCTCCACACCCCTT (SEQ ID NO: 3)

[0090] Em outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeo a montante do promotor do gene de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 como segue:

GACCCGGTGTGCCCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATC
 AAAAATTACCACATATTTTTGGCACACTTATTAAAGTGCAGTTATCTATCTC
 TATACACATATTTAAACTTCACTTATAAATAATAGTTATAGTACTAAACTAAT
 ATCAGTGTAGATAATTATAAATGAACCGCTAGACATGGCTAAAGTACAA
 CCGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTATCTTTAGTGTGCATGTGTT
 TCTCTGTTTTTTCAAATAGCTTGACCTATATAACTTCATCCATTATT
 GTACATCCATTAGGGATTAGGGTTGATGGTTCTATAGACTAATTTTAGTAC
 ATCTATTATTATTATTAAATTTAAAGAAAAGTGAACACTCTATTAGTTA
 CTACAAATTAAACAAATACCCCTTAAGGAATTAAAAAAACTAAGGAAACATT
 CTTGTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACG
 GACACCAACCAGCGAACCGAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAGCGAAGCAGACG
 GCACGGCATCTCTGCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACC
 GTTGGACTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAAGTGCCTGGCGGAGCGGAGA
 CGTGAAGCGGCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGAGCTACGGGGGATTCC
 TTTCCCACCGCTCCTCGCTTCCCTCGCCCCGCCGTAATAATAGACACC
 CCCTCCACACCCCTTT (SEQ ID NO: 4)

Elementos Reguladores Gênicos Adicionais

[0091] A expressão de transgenes pode também ser regulada por uma região 5'-UTR e/ou ítron localizado 3' a jusante da sequência a montante do promotor. Um promotor que compreende uma região a montante do promotor operativamente ligada a uma 5'-UTR e/ou ítron pode regular a expressão do transgene. Embora um promotor a montante seja necessário para comandar a transcrição, a presença de uma 5'-UTR e/ou ítron pode aumentar os níveis de expressão, resultando na produção de mais transcritos de mRNA para tradução e síntese de proteínas. A adição de uma 5'-UTR e/ou ítron a montante de uma sequência de polinucleotídeo do promotor pode auxiliar expressão estável de um transgene.

[0092] Além disso, um promotor constitutivo que compreende uma sequência de polinucleotídeos a montante do promotor pode ser seguido por uma região 5'-UTR ou região líder para auxiliar na expressão de transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos 5'-UTR ou líder do gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como segue:

TCCCCAACCTCGTGGTGGAGCGCACACACACACACCAGATCTCCCCCA
 AATCCACCCGTCGGCACCTCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 5)

[0093] Em uma outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos 5'-UTR ou líder de gene Ubi-1 de

Z. luxurians v1 como segue:

TCCCCAACCTCGTGGTCGGAGCGCACACACACACAACCAGATCTCCCC
AAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAG (SEQ ID NO: 6)

[0094] Ainda, um promotor constitutivo que compreende uma sequência de polinucleotídeos de promotor a montante seguida por uma região 5-UTR ou região líder também pode ser seguido por um ítron para auxiliar na expressão de transgenes em plantas. Em uma modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos intrônica do gene Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 como segue:

GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCTCTACCTCTCTAGATCGGC
GTTCCGGTCCATGCATGGTAGGGCCCGTAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGT
GTTAGATCCGTGTTGTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTGTCACACGGATGC
GACCTGTACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAAGTGCCAGTGTTCTCTGGG
GAATCCTGGGATGGCTAGCCGTTCCGAGACGGGATCGATTTCATGATT
TTTGTTTCGTTGCATAGGGTTGGTTGCCCTTCTTCAATATATGC
CGTGCACTTGTTGTCGGGTCACTTTCATGCTTTTTTGCTTGGTTGTGAT
GATGTGGTCTGGTGGCGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTCAA
CTACCTGGTGGATTATTAAATTGGATCTGTATGTGTGCCATACATATT
AGTTACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTACATG
TTGATGCCGGTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTGTGCTTGGTTG
TGATGATGTGGTGTGGTGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAA
TACTGTTCAAACACCTGGGTGATTATTAAATTGGAACTGTATGTGTGTC
ATACATCTTCATAGTTACGAGTTAACATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAG
GTATACATGTTGATGTGGTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGC
ATCTATTGATGCTTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAAACAGTATGTT
TTATAATTATTCGATCTTGATATACTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTAT
GTGGATTTTTAGCCCTGCCTCATACGCTATTATTGCTTGGTACTGTTCT
TTTGTGATGCTACCCCTGTTGGTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 7)

[0095] Em outra modalidade, um promotor pode compreender uma sequência de polinucleotídeos intrônica do gene Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 como segue:

GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTACCTCTAGATCGGCAATCCG
GTCCATGGTAGGGCCCGATAGTTCTACTTCTGTTCATGTTGTGTTAGATCCG
TGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGACACGTTCTGATT
GCTAACTGCCAGTGTCTCTTGGCGAATCCAGGGATGGCTCTAGCCGTT
CGCAGACGGGTTGATTTCATGATTTGGTTCGTTGCACATAGGGTTGG
TTTGCCTTCTTCTTATTCCTTATGCTGACACTCTTGTGCGGTCATCTT
GTCATGCTCTTTAATCTTGGTTGTGATGATGTGCTCTGGTGGGCGGTCGTT
CTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAGCTACCTGGTGGATTATTAAATTGTA
TCTGTACGTGTGTCACATCTTACAGTTACGAGTTAACATGATGGATGG
AAATATCGATCTAGGATAGGTACATGTTGATGCGGGTTTACTGATGCATAT
ACAGAGATGCTTTTCGCTGGTTGTGATGATGCGGGCTGGTGGCGGT
CGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAACACTACCTGGTGGATTATTAAATT
TGGATCTGATGTGTGTCACATCTTACAGTTACGAGTTAACATGATGG
ATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTACATGTCGATGTGGGTTTACTGATGC
ATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTACATGCTAACCTGAGTACCTA

TCTATTATAATAACAAAGTATGTTTATAATTATTTGACCTTGATATACTTGGAT
 GATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTAGCCTGCCCTCATACGCT
 ATTTATTGTTGGGGCTGTTCTTTGTTGACGCTACCCTGTTGGTGT
 TACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 8)

Cassetes de Expressão de Transgene e Gene Repórter

[0096] A expressão de transgenes pode também ser regulada por um cassete de expressão gênica. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1 de uma planta. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1.

[0097] Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, em que o promotor é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntico à SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor constitutivo, tal como o promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, que está operativamente ligado a um gene repórter ou um transgene. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor constitutivo que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreendendo o promotor constitutivo pode comandar a expressão de um ou mais transgenes ou genes repórter. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreendendo o promotor constitutivo pode comandar a expressão de dois ou mais transgenes ou genes repórter.

[0098] Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, em que a sequência a montante do promotor é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor constitutivo, tal como o promotor a montante Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, que está operativamente ligado a um gene repórter ou um transgene. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor constitutivo a montante que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, uma transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica constitutivo compreendendo o promotor a montante pode comandar a expressão de um ou mais transgenes ou genes repórter. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica constitutivo compreendendo o promotor a montante pode comandar a expressão de dois ou mais transgenes ou genes repórter. Em outra modalidade, o promotor a montante pode compreender um ítron. Em uma modalidade, o promotor a montante pode compreender uma sequência intrônica que está operativamente ligada a um gene repórter ou transgene. Em outra modalidade, o promotor a montante pode compreender uma 5'-UTR ou a sequência líder. Em uma modalidade, o promotor a montante pode compreender uma 5'-UTR ou sequência líder que está operativamente ligada a um gene repórter ou transgene. Em ainda outra modalidade, o promotor a montante pode compreender uma 5'-UTR ou a sequência líder e uma sequência intrônica. Em uma modalidade, o promotor a montante pode

compreender uma 5'-UTR ou a sequência líder e uma sequência intrônica que está operativamente ligada a um gene repórter ou transgene.

[0099] Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, em que a 5'-UTR ou a sequência líder é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 6. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende uma 5'-UTR ou sequência líder de um gene do milho que codifica uma proteína Ubiquitina-1 que está operativamente ligada a um promotor, em que o promotor é um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, um promotor de ubiquitina de *Zea mays* ou *Zea luxurians*), um vírus (por exemplo, promotor do vírus mosaico do veio de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão gênica compreende uma 5'-UTR ou sequência líder de *Z. luxurians* v1 de um gene de milho que codifica uma proteína ubiquitina que está operativamente ligada a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um herbicida transgene tolerância, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos.

[00100] Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1, em que a sequência intrônica é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 8. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um ítron de um gene do milho que codifica uma proteína ubiquitina-1 que está operativamente ligado a um promotor, em que o

promotor é um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* ou *Zea luxurians*), um vírus (por exemplo, promotor do vírus mosaico do veio de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão gênica compreende um ítron de um gene do milho que codifica uma proteína ubiquitina que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos.

[00101] Em uma modalidade, um vetor pode compreender um cassete de expressão gênica conforme descrito aqui. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial (Bacterial Artificial Chromosome - BAC), um bacteriófago, um vírus ou um fragmento de polinucleotídeo excisado em transformação direta ou objetivação gênica, tal como um DNA doador.

[00102] Em uma modalidade, uma célula ou planta compreende um cassete de expressão gênica conforme descrito aqui. Em uma modalidade, uma célula ou planta compreende um vetor compreendendo um cassete de expressão gênica conforme descrito no presente pedido. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial (Bacterial Artificial Chromosome - BAC), um bacteriófago ou um vírus. Deste modo, uma célula ou planta compreendendo um cassete de expressão gênica é uma célula transgênica ou uma planta transgênica, respectivamente.

[00103] Em uma modalidade, uma planta transgênica pode ser uma planta monocotiledônea ou uma planta dicotiledônea. Uma modalidade

de uma planta transgênica monocotiledônea pode ser, porém sem limitações, milho, trigo, arroz, sorgo, aveia, centeio, bananas, cana de açúcar e painço. Uma modalidade de uma planta transgênica dicotiledônea pode ser, porém sem limitações, soja, algodão, girassol ou canola. Uma modalidade também inclui uma semente transgênica de uma planta transgênica, conforme descrito aqui.

Marcadores Selecionáveis

[00104] Vários marcadores selecionáveis, também descritos como genes repórter, podem ser incorporados em um vetor de expressão escolhido para permitir a identificação e seleção das plantas transformadas ("transformantes"). Vários métodos estão disponíveis para confirmar a expressão de marcadores selecionáveis em plantas transformadas incluindo, por exemplo, sequenciamento de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), Southern blotting, hibridização de RNA, métodos imunológicos para detecção de uma proteína expressa a partir do vetor, tal como proteína precipitada que media a resistência à fosfinotricina, observação visual de outras proteínas, tais como genes repórter que codificam β -glucuronidase (β -GlucUronidaSe - GUS), luciferase, proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein - GFP), proteína fluorescente amarela (Yellow Fluorescent Protein - YFP), DsRed, β -galactosidase, acetiltransferase de cloranfenicol (Chloramphenicol AcetylTransferase - CAT), fosfatase alcalina e similares (vide Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Terceira Edição, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001, o conteúdo é aqui incorporado por referência na íntegra).

[00105] Genes marcadores selecionáveis são utilizados para seleção de células ou tecidos transformados. Genes marcadores selecionáveis incluem genes que codificam resistência a antibióticos, tais como aqueles que codificam fosfotransferase II de neomicina (NEO) e fosfotransferase de higromicina (HPT), bem como genes que conferem

resistência a compostos herbicidas. Genes de resistência a herbicidas geralmente codificam uma proteína alvo modificada insensível ao herbicida ou uma enzima que degrada ou desintoxica o herbicida na planta antes que ele possa atuar. Por exemplo, resistência ao glifosato foi obtida usando genes que codificam a enzima alvo mutante sintase de 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (5-EnolpyruvylShikimate-3-Phosphate Synthase - EPSPS). Genes e mutantes de EPSPS são bem conhecidos e ainda descritos abaixo. Resistência aos herbicidas glufosinato de amônio, bromoxinila e 2,4-diclorofenoxyacetato (2,4-D) foi obtida usando genes bacterianos que codificam um gene *pat* ou *DSM-2*, um gene de *nitrilase*, um gene *aad-1* ou *aad-12*, os quais desintoxicam os respectivos herbicidas.

[00106] Em uma modalidade, os herbicidas podem inibir o ponto de crescimento ou meristema, incluindo imidazolinona ou sulfonilureia, e genes para resistência/tolerância à sintetase de aceto-hidroxiácido (Aceto-Hydroxy Acid Synthase - AHAS) e sintase de acetolactato (Aceto-Lactate Synthase - ALS). Genes de resistência a glifosato incluem sintase mutante 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (5-EnolpyruvylShikimate-3-Phosphate Synthase - EPSPS) e genes *dgt-28* através da introdução de ácidos nucleicos recombinantes e/ou várias formas de mutagênese *in vivo* de genes de EPSPS nativos, genes *aroA* e genes de acetil transferase de glifosato (Glyphosate Acetyl Transferase - GAT), respectivamente. Genes de resistência a outros compostos fosfono incluem genes *bar* de espécies *Streptomyces*, incluindo *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces viridichromogenes*, e ácidos piridinóxi ou fenóxi propiônicos e ciclo-hexanodionas (genes que codificam inibidor de ACCase). Exemplos de genes que conferem resistência à ciclo-hexanodionas e/ou ácido arilóxi fenóxi propanoico (incluindo Haloxifop, Diclofop, Fenoxiprop, Fluazifop, Quizalofop) incluem genes de acetil carboxilase de coenzima A (Acetyl Coenzyme A Carboxylase - ACCa-

se) -- Acc1-S1, Acc1-S2 e Acc1-S3. Em uma modalidade, herbicidas podem inibir a fotossíntese, incluindo triazina (genes psbA e 1s+) ou benzonitrilo (gene de nitrilase).

[00107] Em uma modalidade, genes marcadores selecionáveis incluem, porém sem limitações, genes que codificam: fosfotransferase II de neomicina; hidratase de cianamida; quinase de aspartato; sintase de di-hidrodipicolinato; descarboxilase de triptofano; sintase de di-hidrodipicolinato e quinase de aspartato insensível; gene *bar*; descarboxilase de triptofano; fosfotransferase de neomicina (NEO); fosfotransferase de higromicina (HPT ou HYG); redutase de di-hidrofolato (DiHydroFolate Reductase - DHFR); acetiltransferase de fosfinotricina; desalogenase de ácido 2,2-dicloropropiônico; sintase de acetohidroxiácido; sintase de 5-enolpiruvil-chiquimato-fosfato (aroA); haloarilnitrilase; acetil carboxilase de coenzima A; sintase de dihidropteroato (sul I); e polipeptídeo de fotossistema II de 32 kD (psbA).

[00108] Uma modalidade inclui também genes que codificam resistência a: cloranfenicol; metotrexato; higromicina; espectinomicina; bromoxinila; glifosato; e fosfinotricina.

[00109] A lista acima de genes marcadores selecionáveis não se destina a ser limitativa. Qualquer gene repórter ou marcador selecionável é abrangido pela presente invenção.

[00110] Genes marcadores selecionáveis são sintetizados para expressão ótima em plantas. Por exemplo, em uma modalidade, uma sequência de codificação de um gene foi modificada por meio de otimização de códon para aumentar a expressão em plantas. Um gene marcador selecionável pode ser otimizado para expressão em uma espécie particular de planta ou, alternativamente, pode ser modificado para expressão ótima em plantas dicotiledôneas ou monocotiledôneas. Códons preferidos para plantas podem ser determinados a partir dos códons de maior frequência nas proteínas expressas na maior quanti-

dade na espécie particular da planta de interesse. Em uma modalidade, um gene marcador selecionável é concebido para ser expresso em plantas em um nível mais elevado, resultando em maior eficiência de transformação. Métodos para otimização de genes em plantas são bem conhecidos. Orientação em relação à otimização e produção de sequências de polinucleotídeos sintéticas pode ser encontrada, por exemplo, nos documentos WO2013/016546, WO2011/146524, WO1997/013402, Patente dos Estados Unidos N°6.166.302 e Patente dos Estados Unidos N°5.380.831, aqui incorporados por referência.

Transgenes

[00111] Os métodos e composições descritos podem ser usados para expressar sequências gênicas de polinucleotídeo dentro do genoma da planta. Consequentemente, genes que codificam tolerância a herbicida, resistência a insetos, nutrientes, antibióticos ou moléculas terapêuticas podem ser expressos pelo novo promotor.

[00112] Em uma modalidade, o elemento regulador promotor constitutivo da presente descrição é combinado ou operativamente ligado a um ou mais genes que codificam sequências de polinucleotídeos que conferem resistência ou tolerância ao glifosato, 2,4-D glufosinato ou outro herbicida, confere resistência a insetos ou doenças selecionadas e/ou melhorias nutricionais, características agronômicas aprimoradas, proteínas ou outros produtos úteis em alimentação, ração, uso industrial, farmacêutico ou outros. Os transgenes podem ser "empilhados" com duas ou mais sequências de ácidos nucleicos de interesse no genoma de uma planta. Empilhamento pode ser obtido, por exemplo, através de reprodução convencional em plantas usando dois ou mais eventos, transformação de uma planta com um construto que contém as sequências de interesse, nova transformação de uma planta transgênica ou adição de novos traços através de integração homóloga objetivada por meio de recombinação.

[00113] Tais sequências de polinucleotídeos de interesse incluem, porém sem limitações, os exemplos apresentados a seguir:

1. Genes ou Sequência de Codificação que Conferem Resistência à Pragas ou Doenças

[00114] (A) Genes de Resistencia à Doenças de Plantas. Defesas das plantas são muitas vezes ativadas pela interação específica entre o produto de um gene de resistência à doenças (R) na planta e o produto de um gene de avirulência (Avr) correspondente no patógeno. Uma variedade de plantas podem ser transformadas com o gene de resistência clonado para manipular plantas que sejam resistentes à cepas patogênicas específicas. Exemplos de tais genes incluem o gene Cf-9 de tomate para resistência a *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994 Science 266: 789), o gene *Pto* de tomate, o qual codifica uma quinase de proteína para resistência a *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Martin et al., 1993 Science 262: 1432) e o gene RSSP2 de *Arabidopsis* para resistência a *Pseudomonas syringae* (Mindrinos et al., 1994 Cell 78: 1089).

[00115] (B) Uma proteína de *Bacillus thuringiensis*, um derivado da mesma ou um polipeptídeo sintético modelado com base na mesma, tal como uma sequência de nucleotídeos de um gene de δ-endotoxina de *Bt* (Geiser et al., 1986 Gene 48: 109) e um gene inseticida vegetativo (VIP) (vide, por exemplo, Estruch et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5389-94). Além disso, moléculas de DNA que codificam genes de δ-endotoxinas podem ser adquiridas da American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, EUA), sob números de acesso ATCC 40098, 67136, 31995 e 31998.

[00116] (C) Uma lectina, tal como sequências de nucleotídeos de vários genes de lectina que se ligação à manose de *Clivia miniata* (Van Damme et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24: 825).

[00117] (D) Uma proteína que se ligação à vitaminas, tal como avi-

dina e homólogos de avidina, os quais são úteis como larvicidas contra pragas de insetos de ligação da vitamina. Vide Patente dos Estados Unidos N°5.659.026.

[00118] (E) Um inibidor enzimático, por exemplo, um inibidor de protease ou um inibidor de amilase. Exemplos de tais genes incluem um inibidor de proteinase de cisteína de arroz (Abe et al., 1987 J. Biol. Chem. 262: 16793), um inibidor I de protease de tabaco (Huub et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21: 985) e um inibidor de α -amilase (Sumitani et al., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1243).

[00119] (F) Um hormônio ou ferormônio específico para insetos, tal como um ecdiesteroide e hormônio juvenil e uma variante dos mesmos, um mimético com base nos mesmos ou um antagonista ou agonista dos mesmos, tal como expressão em baculovírus de hormônio juvenil esterase clonado, um inativador de hormônio juvenil (Hammock et al., 1990 Nature 344: 458).

[00120] (G) Um peptídeo ou neuropeptídeo específico para insetos o qual, quando de expressão, altera a fisiologia da praga afetada (J. Biol. Chem. 269: 9). Exemplos de tais genes incluem um receptor de hormônio diurético de insetos (Regan, 1994), uma alostatina identificada em *Diptoptera punctata* (Pratt, 1989) e neurotoxinas paralisantes específicas para insetos (Patente dos Estados Unidos N°5.266.361).

[00121] (H) Um veneno específico para inseto produzido na natureza por uma cobra, uma vespa, etc., tal como um peptídeo inseto-tóxico de escorpião (Pang, 1992 Gene 116: 165).

[00122] (I) Uma enzima responsável por um hiperacúmulo de monoterpeno, um sesquiterpeno, um esteroide, ácido hidroxâmico ou um derivado de fenilpropanoide ou outra molécula não proteica com atividade inseticida.

[00123] (J) Uma enzima envolvida na modificação, incluindo a modificação pós-traducional, de uma molécula biologicamente ativa; por

exemplo, uma enzima glicolítica, uma enzima proteolítica, uma enzima lipolítica, uma nuclease, uma ciclase, uma transaminase, uma esterase, uma hidrolase, uma fosfatase, uma quinase, uma fosforilase, uma polimerase, uma elastase, uma quitinase e uma glucanase, seja natural ou sintética. Exemplos de tais genes incluem um gene callas (Pedido PCT Publicado WO93/02197), sequências que codificam quitinase (as quais podem ser obtidas, por exemplo, da ATCC sob os números de acesso 67152 e 3999637), quitinase de ancilóstomo de tabaco (Kramer et al., 1993 Insect Molec. Biol. 23: 691) e o gene de poliubiquitina ubi4-2 de salsa (Kawalleck et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21: 673).

[00124] (K) Uma molécula que estimula a transdução de sinal. Exemplos de tais moléculas incluem sequências de nucleotídeos para os clones de cDNA de calmodulina de feijão mungo (Botella et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24: 757) e uma sequência de nucleotídeos de um clone de cDNA de calmodulina de milho (Griess et al., 1994 Plant Physiol. 104: 1467).

[00125] (L) Um peptídeo de momento hidrofóbico. Vide Patentes dos Estados Unidos N^{os} 5.659.026 e 5.607.914; a última ensina peptídeos antimicrobianos sintéticos que conferem resistência à doenças.

[00126] (M) Uma permease da membrana, um formador de canal ou um bloqueador de canal, tal como um análogo de um peptídeo lítico de β-cecropina (Jaynes et al., 1993 Plant Sci. 89: 43), o qual torna plantas de tabaco transgênicas resistentes a *Pseudomonas solanacearum*.

[00127] (N) Uma proteína viral invasiva ou uma toxina complexa derivada da mesma. Por exemplo, o acúmulo de proteínas do envelope viral em células de plantas transformadas confere resistência à infecções virais e/ou desenvolvimento de doenças causadas pelo vírus a partir do qual o gene da proteína do envelope é derivada, bem como vírus relacionados. Resistência mediada por proteína do envelope foi

conferida à plantas transformadas contra o vírus mosaico da alfafa, vírus mosaico do pepino, vírus da listra de tabaco, vírus X de batata, vírus Y de batata, vírus da mancha de tabaco, vírus da mancha marrom de tabaco e vírus mosaico do tabaco. Vide, por exemplo, Beachy et al. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28: 451.

[00128] (O) Um anticorpo específico para inseto ou uma imunotoxina derivada do mesmo. Assim, um anticorpo objetivado a uma função metabólica crítica no intestino do inseto poderia inativar uma enzima afetada, matando o inseto. Por exemplo, Taylor et al. (1994) Abstract #497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions, mostram inativação enzimática em plantas transgênicas de tabaco através de produção de fragmentos de anticorpos fita simples.

[00129] (P) Um anticorpo específico para vírus. Vide, por exemplo, Tavladoraki et al. (1993) Nature 266: 469, os quais mostram que plantas transgênicas que expressam genes de anticorpos recombinantes são protegidas contra ataque viral.

[00130] (Q) Uma proteína que interrompe o desenvolvimento produzida na natureza por um patógeno ou um parasita. Assim, α-1,4-D-poligalacturonases fúngicas facilitam a colonização fúngica e liberação de nutrientes de plantas ao solubilizar a homo-α-1,4-D-galacturonase na parede de células de plantas (Lamb et al., 1992) Bio/Technology 10: 1436). A clonagem e caracterização de um gene o qual codifica uma proteína de inibição de endopoligalacturonase de feijão são descritas por Toubart et al. (1992 Plant J. 2: 367).

[00131] (R) Uma proteína que interrompe o desenvolvimento produzida na natureza por uma planta, tal como o gene de inativação de ribossomo de cevada, que confere uma maior resistência à doenças fúngicas (Longemann et al., 1992). Bio/Technology 10: 3305).

[00132] (S) Interferência de RNA, na qual uma molécula de RNA é usada para inibir a expressão de um gene-alvo. Uma molécula de

RNA, em um exemplo, é parcial ou totalmente fita dupla, o que desencadeia uma resposta de silenciamento, resultando em clivagem do dsRNA em pequenos RNAs de interferência os quais são, então, incorporados em um complexo alvo que destrói mRNAs homólogos. Vide, por exemplo, Fire et al., Patente dos Estados Unidos N°6.506.559; Graham et al., Patente dos Estados Unidos N°6.573. 099.

2. Genes que Conferem Resistência a um Herbicida

[00133] (A) Genes que codificam resistência ou tolerância a um herbicida que inibe o ponto de crescimento ou meristema, tal como um herbicida de imidazalinona, sulfonanilida ou sulfonilureia. Genes exemplificativos nesta categoria codificam uma enzima ALS mutante (Lee et al., 1988 EMBOJ. 7: 1241), a qual é também conhecida como enzima AHAS (Miki et al., 1990 Theor. Appl. Genet. 80: 449).

[00134] (B) Um ou mais genes adicionais que codificam resistência ou tolerância ao glifosato conferida por genes de sintase de EPSP e aroA mutantes, ou através de inativação metabólica por genes, tais como GAT (acetiltransferase de glifosato) ou GOX (oxidase de glifosato) e outros compostos de fosfona, tais como glufosinato (genes *pat* e *bar*; DSM-2) e ácidos ariloxifenoxipropiônico e ciclo-hexanodionas (genes que codificam inibidor de ACCase). Vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos N°4.940.835, a qual descreve a sequência de nucleotídeos de uma forma de EPSP que pode conferir resistência ao glifosato. Uma molécula de DNA que codifica um gene aroA mutante pode ser obtida sob Número de Acesso ATCC 39256 e a sequência de nucleotídeos do gene mutante é descrita na Patente dos Estados Unidos N° 4.769.061. O Pedido de Patente Europeia N° 0 333 033 e Patente dos Estados Unidos N° 4.975.374 descrevem seq uências de nucleotídeos de genes de sintetase de glutamina que conferem resistência a herbicidas, tal como L-fosfinotricina. A sequência de nucleotídeos de um gene de acetiltransferase de fosfinotricina é fornecida no Pedido

de Patente Europeia N° 0 242 246. De Greef et al. (1989) Bio/Technology 7: 61 descrevem a produção de plantas transgênicas que expressam genes *bar* quiméricos os quais codificam atividade de acetil transferase de fosfinotricina atividade. Exemplos de genes que conferem resistência ao ácido ariloxifenoxipropiônico e ciclohexanodionas, tais como setoxidim e haloxifop, são os genes Accl-S1, Accl-S2 e Accl-S3 descritos por Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83: 435.

[00135] (C) Genes que codificam resistência ou tolerância a um herbicida que inibe a fotossíntese, tal como uma triazina (genes *psbA* e *gs+*) e um benzonitrilo (gene de nitrilase). Przibilla et al. (1991) Plant Cell 3: 169 descrevem o uso de plasmídeos que codificam genes *psbA* mutantes para transformar *Chlamydomonas*. Sequências de nucleotídeos para genes de nitrilase são descritas na Patente dos Estados Unidos N° 4.810.648 e moléculas de DNA que contêm estes genes estão disponíveis sob números de acesso ATCC 53435, 67441 e 67442. Clonagem e expressão de DNA que codifica uma S-transferase de glutationa são descritas por Hayes et al. (1992) Biochem. J. 285: 173.

[00136] (D) Genes que codificam resistência ou tolerância a um herbicida que se liga à enzimas dioxigenase de hidroxifenilpiruvato (HPPD), as quais catalisam a reação na qual para-hidroxifenilpiruvato (HPP) é transformado em homogentisato. Isso inclui herbicidas tais como isoxazolas (documentos EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, Patente dos Estados Unidos N° 5.424.276), em particular isoxaflutola, a qual é um herbicida seletivo para milho, dicetonitrilos (documentos EP496630, EP496631), em particular 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-fenil)propano-1,3-diona e 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂-fenil)propano-1,3-diona, tricetonas (documentos EP625505, EP625508, Patente dos Estados Unidos N° 5.506.195), em particular sulcotriona, e pirazolinatos.

Um gene que produz uma superabundância de HPPD em plantas pode conferir tolerância ou resistência a herbicidas tais como, por exemplo, aqueles descritos nas Patentes dos Estados Unidos N°s 6.268.549 e 6.245.968 e Publicação de Pedido de Patente dos Estados Unidos N°2003/0066102.

[00137] (E) Genes que codificam resistência ou tolerância a herbicidas de auxina, tal como ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), e os quais podem também conferir resistência ou tolerância a herbicidas de ariloxifenóxipropionatos (AOPP). Exemplos de tais genes incluem o gene da enzima dioxigenase dependente de α -cetoglutarato (*aad-1*) descrito na Patente dos Estados Unidos N°7.838.733 .

[00138] (F) Genes que codificam resistência ou tolerância a herbicidas de auxina, tal como ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), e os quais podem também conferir resistência ou tolerância a herbicidas de piridilóxi auxina, tais como fluroxipir ou triclopir. Exemplos de tais genes incluem o gene da enzima dioxigenase dependente de α -cetoglutarato (*add-12*), descrito no documento WO 2007/053482 A2.

[00139] (G) Genes que codificam resistência ou tolerância ao dicamba (vide, por exemplo, Publicação de Patente dos Estados Unidos N° 2003/0135879).

[00140] (H) Genes que conferem resistência ou tolerância a herbicidas que inibem a oxidase de protoporfirinogênio (PPO) (vide Patente dos Estados Unidos N° 5.767.373).

[00141] (I) Genes que conferem resistência ou tolerância a herbicidas de triazina (tal como atrazina) e herbicidas derivados de ureia (tal como diuron) os quais se ligam à proteínas do núcleo de centros de reação de fotossistema II (PS II) (vide Brussian et al., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245).

3. Genes que Conferem ou Contribuem para um Traço de Valor Adicionado

[00142] (A) Metabolismo de ácidos graxos modificado, por exemplo, através da transformação de milho ou *Brassica* com um gene antisenso ou desaturase de estearoil-ACP para aumentar o teor de ácido esteárico na planta (Knultzon et al., 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 2624).

[00143] (B) Teor de fitato reduzido:

[00144] (1) Introdução de um gene que codifica fitase, tal como o gene de fitase de *Aspergillus niger* (Van Hartingsveldt et al., 1993 Gene 127: 87), o qual aumenta a decomposição de fitato, adicionando mais fosfato livre à planta transformada.

[00145] (2) Poderia ser introduzido um gene que reduz o teor de fitato. Em milho, por exemplo, isto pode ser obtido por meio de clonagem e, então, reintrodução do DNA associado com o único alelo que é responsável por mutantes de milho caracterizados por baixos níveis de ácido fítico (Raboy et al, 1990 Maydica 35: 383).

[00146] (C) Composição de carboidrato modificada causada, por exemplo, pela transformação de plantas com um gene que codifica uma enzima que altera o padrão de ramificação de amido. Exemplos de tais enzimas incluem, gene de frutosiltransferase de *Streptococcus mucus* (Shiroza et al., 1988, J. Bacteriol. 170: 810), gene de levansucrase de *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al., 1985 Mol. Gen. Genel. 200: 220), α-amilase de *Bacillus licheniformis* (Pen et al, 1992, Bio/Technology 10: 292), genes de invertase de tomate (Elliot et al, 1993), gene de amilase de cevada (Sogaard et al., 1993 J. Biol. Chem. 268: 22480) e enzima II de ramificação de amido em endosperma de milho (Fisher et al., 1993 Plant Physiol 102: 10450).

Transformação

[00147] Métodos adequados para transformação de plantas incluem qualquer método pelo qual o DNA pode ser introduzido em uma célula, por exemplo, e sem limitação: eletroporação (vide, por exemplo, Pa-

tente dos Estados Unidos N° 5.384.253); bombardeamento com microprojétil (vide, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N°s 5.015.580, 5.550.318, 5.538.880, 6.160.208, 6.399.861 e 6.403.865); transformação mediada por *Agrobacterium* (vide, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N°s 5.635.055, 5.824.877, 5.591.616, 5.981.840 e 6.384.301); e transformação de protoplastos (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos N° 5.508.184). Estes métodos podem ser usados para transformar de forma estável ou transitória uma planta.

[00148] Um construto de DNA pode ser introduzido diretamente no DNA genômico da célula de planta usando técnicas tais como agitação com fibras de carboneto de silício (vide, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N°s 5.302.523 e 5.464.765) ou construtos de DNA podem ser introduzidos diretamente no tecido da planta usando métodos biológicos, tal como bombardeamento de partículas de DNA (vide, por exemplo, Klein et al. (1987) *Nature* 327: 70-73). Alternativamente, o construto de DNA pode ser introduzido na célula da planta através de transformação com nanopartículas (vide, por exemplo, Publicação de Patente dos Estados Unidos N° 20090104700, a qual é aqui incorporada por referência na íntegra).

[00149] Além disso, transferência de genes pode ser obtida usando bactérias que não *Agrobacterium* ou vírus, tal como *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, vírus X da batata, vírus mosaico da couve-flor e o vírus mosaico do veio de mandioca e/ou vírus mosaico do tabaco. Vide, por exemplo, Chung et al. (2006) *Trends Plant Sci.* 11 (1): 1-4.

[00150] Através da aplicação de técnicas de transformação, células de virtualmente todas as espécies de plantas podem ser transformadas de forma estável e estas células podem ser desenvolvidas em plantas transgênicas por meio de técnicas bem conhecidas. Por e-

xemplo, técnicas que podem ser particularmente úteis no contexto de transformação de algodão são descritas nas Patentes dos Estados Unidos N^{os} 5.846.797, 5.159.135, 5.004.863 e 6.624.344; técnicas para transformação de plantas *Brassica* são descritas, em particular, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos N° 5.750.871 ; técnicas para transformação de semente de soja são descritas, por exemplo, na Patente dos Estados Unidos N° 6.384.301; e técnicas para transformação de milho são descritas, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N^{os} 7.060.876 e 5.591.616 e Publicação Internacional PCT WO 95/06722.

[00151] Após realizar distribuição de um ácido nucleico exógeno a uma célula receptora, uma célula transformada é geralmente identificada para posterior cultura e regeneração de plantas. A fim de aprimorar a capacidade de identificar transformantes, pode ser desejado usar um gene marcador selecionável com o vetor de transformação usado para gerar o transformante. Em uma modalidade ilustrativa, uma população de células transformadas pode ser avaliada expondo as células a um agente ou agentes seletivos ou as células podem ser pesquisadas quanto ao traço do gene marcador desejado.

[00152] Células que sobrevivem à exposição a um agente seletivo ou células que foram marcadas positivas em um ensaio de rastreio podem ser cultivadas em meios que suportam a regeneração de plantas. Em uma modalidade, qualquer meio de cultura de tecido de planta apropriado pode ser modificado pela inclusão de outras substâncias, tais como reguladores de crescimento. Tecido pode ser mantido em um meio de base com reguladores de crescimento tecidual suficientes até que esteja disponível para começar esforços de regeneração de planta ou após ciclos repetidos de seleção manual, até que a morfologia do tecido seja adequada para regeneração (por exemplo, pelo menos 2 semanas), então, transferido para o meio propício para disparar

formação. As culturas são transferidas periodicamente até que formação de rebentos suficiente tenha ocorrido. Uma vez que os brotos são formados, eles são transferidos para meio propício para a formação de raízes. Uma vez as raízes formadas são suficientes, as plantas podem ser transferidas para o solo para crescimento e maturação.

[00153] Para confirmar a presença de um ácido nucleico desejado compreendendo os construtos fornecidos em plantas em regeneração, uma variedade de ensaios podem ser realizados. Tais ensaios podem incluir: ensaios de biologia molecular, tais como Southern e Northern blotting e PCR; ensaios bioquímicos, tal como detecção da presença de um produto de proteína, por exemplo, por meios imunológicos (ELISA, Western blot e/ou espectrofotometria de massa LC-MS) ou pela função enzimática; ensaios de partes de plantas, tais como ensaios de folha ou raiz; e/ou a análise do fenótipo da planta inteira regenerada.

[00154] Eventos transgênicos podem ser rastreados, por exemplo, por amplificação por PCR usando, por exemplo, iniciadores de oligonucleotídeos específicos para as moléculas de ácido nucleico de interesse. Genotipagem por PCR deve ser entendida como incluindo, porém sem limitações, amplificação de DNA genômico por reação em cadeia de polimerase (PCR) derivado de tecido de caule da planta hospedeira isolado que se espera conter uma molécula de ácido nucleico de interesse integrada no genoma, seguido por clonagem e análise convencionais da sequência dos produtos de amplificação por PCR. Os métodos de genotipagem por PCR foram bem descritos (vide, por exemplo, Rios et al (2002) *Plant J.* 32: 243-53) e podem ser aplicados ao DNA genômico derivado de qualquer espécie de planta ou tipo de tecido, incluindo culturas de células.

[00155] Combinações de iniciadores de oligonucleotídeo que se ligam tanto à sequência alvo quanto à sequência introduzida podem ser usadas sequencialmente ou multiplexadas em reações de amplificação

por PCR. Iniciadores de oligonucleotídeo concebidos para emparelhar com o sítio alvo, sequências de ácido nucleico introduzidas e/ou combinações de ambos podem ser produzidos. Assim, estratégias de genotipagem por PCR podem incluir, por exemplo, e sem limitação: amplificação de sequências específicas no genoma da planta; amplificação de várias sequências específicas no genoma da planta; amplificação de sequências não específicas no genoma da planta; e combinações de qualquer um dos precedentes. Aqueles versados na técnica podem conceber combinações adicionais de iniciadores e reações de amplificação para investigar o genoma. Por exemplo, um conjunto de iniciadores de oligonucleotídeo direto e reverso pode ser concebido para emparelhar com sequência(s) de ácido nucleico específica(s) para o alvo fora dos limites da sequência de ácido nucleico introduzida.

[00156] Iniciadores de oligonucleotídeos direto e reverso podem ser concebidos para hibridizar especificamente com uma molécula de ácido nucleico introduzida, por exemplo, uma sequência que corresponde a uma região codificadora dentro de uma sequência de nucleotídeos de interesse compreendida na mesma ou outras partes da molécula de ácido nucleico. Iniciadores podem ser usados em conjunto com os iniciadores descritos aqui. Os iniciadores de oligonucleotídeo podem ser sintetizados de acordo com uma sequência desejada e estão comercialmente disponíveis (por exemplo, da Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). A amplificação pode ser seguida por clonagem e sequenciamento ou por análise direta de sequência dos produtos de amplificação. Em uma modalidade, iniciadores de oligonucleotídeo específicos para o gene-alvo são empregados em amplificações por PCR.

Método de Expressão de um Transgene

[00157] Em uma modalidade, um método de expressão de pelo menos um transgene em uma planta compreende crescimento de uma

planta compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente ligado a pelo menos um transgene. Em uma modalidade, um método de expressão de pelo menos um transgene em uma célula de planta ou um tecido de planta compreende cultura de uma célula de planta ou tecido de planta compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente ligado a pelo menos um transgene.

[00158] Em uma modalidade, um método de expressão de pelo menos um transgene em uma planta compreende crescimento de uma planta compreendendo um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente ligado a pelo menos um transgene. Em outra modalidade, um método de expressão de pelo menos um transgene em uma célula de planta ou tecido de planta compreende cultura de um tecido de planta ou célula de planta compreendendo um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente ligado a pelo menos um transgene.

[00159] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) operativamente ligado a um transgene, em que um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2) é compreendido de um promotor a montante (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) e um ítron (SEQ ID NO: 8). Em uma modalidade, uma planta, células de tecido de planta ou planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) e um ítron (SEQ ID NO: 8). Em uma modalidade, uma planta, células de tecido de planta ou planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) e um

ítron (SEQ ID NO: 8) de um gene Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. Em uma modalidade, uma planta, células de tecido de planta ou planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante (SEQ ID NO: 4), 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) e um ítron (SEQ ID NO: 8) de um gene Ubi-1 de *Z. luxurians* v1.

[00160] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. Em uma modalidade, um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 pode ser SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor, em que o promotor é pelo menos 80 %, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntico à SEQ ID NO: 2. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão compreendendo um gene promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos.

[00161] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante. Em uma modalidade, um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante pode ser a SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expres-

são gênica compreendendo um promotor a montante, em que o promotor a montante é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntico à SEQ ID NO: 4. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante que está operativamente ligado a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene tolerância herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos.

[00162] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende uma sequência 5'-UTR ou líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. Em uma modalidade, uma 5'-UTR ou sequência líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 pode ser um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 6. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo uma 5'-UTR ou a sequência líder, em que a 5'-UTR ou a sequência líder é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 6. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende uma 5'-UTR ou líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligada a um promotor, em que o promotor é um promotor da ubiquitina ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* ou *Zea luxurians*), um vírus (por exemplo, promotor do vírus mosaico do veio de mandioca) ou uma bactéria (por

exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo uma 5'-UTR ou sequência líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligada a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou uma célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo uma 5'-UTR ou sequência líder de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligada a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicidas, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos.

[00163] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um ítron de Ubi-1. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um ítron de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. Em uma modalidade, um ítron de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 pode ser um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 8. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um ítron, em que o ítron é pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% ou 100% idêntico à SEQ ID NO: 8. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um ítron de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um promotor, em que o promotor é um promotor de ubiquitina ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* ou *Zea luxurians*), um vírus (por exemplo, veia promotor do vírus do mosaico da mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta

compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um íntron de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um transgene. Em uma modalidade ilustrativa, uma planta, tecido de planta ou uma célula de planta compreendendo um cassete de expressão gênica compreende um íntron de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos.

[00164] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um cassete de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 a montante, íntron de Ubi-1 e uma 5'-UTR de Ubi-1 que estão operativamente ligados a um transgene. O promotor Ubi-1 de *Z. luxurians*, íntron de Ubi-1 e 5'-UTR de Ubi-1 podem ser operativamente ligados a diferentes transgenes dentro de um cassete de expressão gênica quando um cassete de expressão gênica inclui dois ou mais transgenes. Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão gênica compreende um promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão gênica compreende um íntron de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um

transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, um cassete de expressão gênica compreende um ítron de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligado a um promotor, em que o promotor é um promotor de ubiquitina ou um promotor que se origina de uma planta (por exemplo, um promotor de ubiquitina-1 de *Zea mays* ou *Zea luxurians*), um vírus (por exemplo, promotor do vírus mosaico do veio de mandioca) ou uma bactéria (por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* delta mas). Em uma modalidade ilustrativa, um cassete de expressão gênica compreende uma 5'-UTR de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 que está operativamente ligada a um transgene, em que o transgene pode ser um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicidas, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso da água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, um transgene de marcador selecionável ou combinações dos mesmos.

[00165] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um vetor compreendendo um elemento regulador de promotor gênico constitutivo, conforme descrito aqui. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um vetor compreendendo um elemento regulador de promotor gênico constitutivo, conforme descrito aqui, operativamente ligado a um transgene. Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta compreende um vetor compreendendo um cassete de expressão gênica, conforme descrito aqui. Em uma modalidade, um vetor pode ser um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossoma bacteriano artificial (Bacterial Artificial Chromosome - BAC), um bacteriófago ou um fragmento de vírus.

[00166] Em uma modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta de acordo com os métodos descritos aqui pode ser de uma planta monocotiledônea. A planta, tecido de planta ou célula de planta monocotiledônea pode ser, porém sem limitações, milho, arroz, trigo, cana-de-açúcar, cevada, centeio, sorgo, orquídeas, bambu, banana, capim rabo-de-gato, lírios, aveia, cebola, milho, trigo e triticale. Em outra modalidade, uma planta, tecido de planta ou célula de planta de acordo com os métodos descritos aqui pode ser uma planta dicotiledônea. A planta, tecido de planta ou célula de planta dicotiledônea pode ser, porém sem limitações, colza, canola, mostarda Indiana, mostarda da Etiópia, soja, girassol e algodão.

[00167] Em relação à produção de plantas geneticamente modificadas, métodos para a engenharia genética de plantas são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, foram desenvolvidos vários métodos para transformação de plantas, incluindo protocolos de transformação biológica e física para plantas dicotiledôneas, bem como plantas monocotiledôneas (por exemplo, Goto-Fumiyuki *et al.*, *Nature Biotech* 17: 282-286 (1999); Miki *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. e Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, páginas 67-88 (1993)). Além disso, vetores e métodos para cultura *in vitro* de células de plantas ou para transformação e regeneração de tecidos de plantas estão disponíveis, por exemplo, em Gruber *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. e Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, páginas 89-119 (1993).

[00168] Aqueles versados na técnica reconhecerão que, após a sequência exógena ser estavelmente incorporada em plantas transgênicas e confirmada como operável, ela pode ser introduzida em outras plantas por meio de cruzamento sexual. Qualquer uma de uma série de técnicas de reprodução convencionais pode ser usada, dependen-

do da espécie a ser cruzada.

[00169] Uma célula de planta, caule, tecido ou planta transformada pode ser identificada e isolada através de seleção ou rastreio do material de planta manipulado quanto a traços codificados pelos genes marcadores presentes no DNA de transformação. Por exemplo, seleção pode ser realizada através de crescimento do material de planta manipulado em um meio contendo uma quantidade inibidora do antibiótico ou herbicida ao qual o elemento gênico confere resistência à transformação. Além disso, as células transformadas também podem ser identificadas rastreando a atividade de quaisquer genes marcadores visíveis (por exemplo, genes de YFP, GFP, β -glucuronidase, luciferase, B ou C1) que possam estar presentes nos construtos de ácido nucleicos recombinantes. Tais metodologias de rastreio e seleção são bem conhecidas por aqueles versados na técnica.

[00170] Métodos físicos e bioquímicos também podem ser usados para identificar transformantes de plantas ou células de plantas que contêm os construtos gênicos inseridos. Estes métodos incluem, porém sem limitações: 1) análise de Southern ou amplificação por PCR para detectar e determinar a estrutura do inserto de DNA recombinante; 2) Northern blot, proteção com RNase S1, extensão de iniciadores ou amplificação por PCR com transcriptase reversa para detectar e analisar transcritos de RNA dos construtos gênicos; 3) ensaios enzimáticos para detecção de atividade enzimática ou ribozima onde tais produtos gênicos são codificados pelo construto gênico; 4) análise de Sequenciamento de Próxima Geração; 5) eletroforese em gel de proteína, técnicas de Western blot, imunoprecipitação ou imunoensaios ligados à enzima (ELISA) onde os produtos do construto gênico são proteínas. Outras técnicas, tais como hibridização *in situ*, coloração enzimática e imunocoloração, também pode ser usadas para detectar a presença ou expressão do construto recombinante em órgãos e tecido-

dos específicos de uma planta. Métodos para fazer todos esses ensaios são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

[00171] Efeitos da manipulação gênica usando os métodos descritos aqui podem ser observados, por exemplo, através de Northern blot do RNA (por exemplo, mRNA) isolado de tecidos de interesse. Tipicamente, se o mRNA está presente ou a quantidade de mRNA aumentou, pode-se presumir que o transgene correspondente está sendo expresso. Outros métodos de medição de atividade do gene ou polipeptídeo codificado podem ser usados. Diferentes tipos de ensaios enzimáticos podem ser usados, dependendo do substrato empregado e do método de detecção do aumento ou diminuição de um produto ou subproduto de reação. Além disso, os níveis do polipeptídeo expresso podem ser medidos imunoquimicamente, isto é, usando ELISA, RIA, EIA e outros ensaios com base em anticorpos bem conhecidos por aqueles versados na técnica, tal como por meio de ensaios de detecção eletroforéticos (com coloração ou Western blotting). Como um exemplo não limitativo, a detecção das proteínas AAD-1 (dioxigenase de arilóxialcanoato; vide documento WO 2005/107437) e PAT (N-acetil-transferase de fosfinotricina), EC 2.3.1.183) usando um ensaio ELISA é descrita na Publicação de Patente dos Estados Unidos N°20090093366, a qual é a qui incorporada por referência na íntegra. O transgene pode ser expresso seletivamente em alguns tipos de tecidos ou células de planta ou em alguns estágios de desenvolvimento ou o transgene pode ser expresso em praticamente todos os tecidos da planta, substancialmente ao longo de todo seu ciclo de vida. No entanto, qualquer modo de expressão combinatorial também é aplicável.

[00172] A presente descrição também abrange sementes de plantas transgênicas descritas acima, em que a semente tem o transgene ou construto gênico. O presente relatório descritivo abrange ainda a

descendência, clones, linhagens de células ou células de plantas transgênicas descritas acima, em que a dita descendência, clone, célula ou linhagem de células tem o transgene ou construto gênico.

[00173] Embora a invenção tenha sido descrita com referência a métodos e modalidades específicas, será apreciado que várias modificações e alterações podem ser feitas sem se afastar da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Identificação e Isolamento de Novo Promotor

[00174] Uma nova sequência promotora do gene Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 foi amplificada usando reação em cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR). Oligonucleotídeos (Tabela 1) concebidos para amplificar o novo promotor, *Z. luxurians* v1, foram derivados de regiões conservadas da sequência promotora Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73, a qual serviu como controle. Um produto de PCR foi obtido a partir de *Z. luxurians* v1 e foi caracterizado.

[00175] O produto de PCR compreendendo o novo promotor foi clonado em vetores Topo™ usando Invitrogen Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit de acordo com as instruções do fabricante. Um mapa de vetor mostrando o plasmídeo clonado compreendendo o produto de PCR do novo promotor é fornecido. O plasmídeo pDAB105710 corresponde a *Z. luxurians* v1 (Figura 2).

Tabela 1: iniciadores usados para amplificação por PCR de novos promotores Ubi-1

	Seq. ID No:
Iniciador direto: GCTACCGCGGACCCGGTGTGCCCTCTAGAGATAATG	9
Iniciador reverso: AGTCAGGTACCCTGCAGAAGTAACACCAAACACAG	10
A sequência promotora específica dos iniciadores de PCR está sublinhada.	
A sequência do iniciador localizada 5' a montante da sequência promotora específica é uma sequência ligante usada para clonagem.	

[00176] Após clonagem, o inserto do promotor contendo o produto de PCR foi sequenciado usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. As sequências de polinucleotídeos do promotor de

Z. luxurians v1 (Figura 4) foram computacionalmente alinhadas e subsequentemente analisadas por homologia de sequência com a sequência de controle de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figura 3). Métodos de bioinformática e/ou programas de software conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como ClustalW ou Sequencher, foram usados para realizar a análise de homologia de sequência.

Exemplo 2: Caracterização do Novo Promotor

[00177] Análise de homologia de sequência (Figuras 3-7), incluindo alinhamento de sequência e comparação com a sequência de controle de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (SEQ ID NO: 1; Figura 3) revelou um novo promotor Ubi-1 para posterior caracterização. Observou-se também que a nova sequência do promotor Ubi-1, obtida a partir de *Z. luxurians* v1 (SEQ ID NO: 2; Figura 4), compreendia sequências de polinucleotídeos constituídas de três regiões distintas: 1) uma região de promotor a montante (SEQ ID NO: 4), 2) uma 5'-UTR (SEQ ID NO: 6) e 3) um ítron (SEQ ID NO: 8). As regiões do promotor e elementos específicos do promotor de *Z. luxurians* v1 foram analisados por homologia de sequência com a sequência de controle de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figuras 5-7). Mais especificamente, alinhamento da sequência foi realizado para comparar, independentemente, elementos reguladores promotor a montante, 5'-UTR e regiões intrônicas, bem como a caixa TATA e Elemento de Choque Térmico (Heat Shock Element - HSE) do promotor de *Z. luxurians* v1 com as regiões correspondentes da sequência de controle de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figuras 5-7, Tabela 2).

Tabela 2: homologia de sequência (%) entre promotor Ubi-1 de *Z. mays* B73 e novo promotor Ubi-1

Promotor	Total	Promotor a montante	5'-UTR / líder	Ítron	Caixa TATA	Elemento de Choque Térmico
<i>Z. luxurians</i> v1	90,4	87,8	98,8	91,7	100	100

[00178] A Figura 5 mostra o alinhamento de sequências das regiões promotoras a montante do promotor de *Z. luxurians* v1 comparado com a região promotora a montante da sequência do promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 de controle. A Figura 6 mostra o alinhamento de sequência da 5'-UTR ou sequência líder do promotor de *Z. luxurians* v1 comparado com a 5'-UTR ou sequência líder da sequência do promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 de controle. A Figura 7 mostra o alinhamento de sequências das regiões intrônicas de Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 comparado com a sequência intrônica da sequência do promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 de controle.

[00179] Os elementos promotores obtidos a partir de *Z. luxurians* v1 mostraram 90,4% de identidade de sequência total (Tabela 2) à sequência de Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. Caracterização da nova sequência promotora de *Z. luxurians* v1 confirmou que a maior parte dos elementos reguladores do promotor (isto é, uma caixa TATA ou Elemento de Choque Térmico) tipicamente encontrados em um promotor funcional também estavam altamente conservados dentro das regiões promotoras centrais do gene Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (Tabela 2). Por exemplo, a Figura 5 mostra uma caixa TATA altamente conservada (pares de bases 869-876 mostrados sublinhados) que foi identificada e se descobriu estar localizada aproximadamente 50 pb 5' a montante do TSS na região promotora a montante do novo promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1. Embora apenas pequenos níveis de variação fossem observados na região 5'-UTR ou na sequência líder do novo promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (Figura 4), o qual tinha 98,8% de homologia de sequência com a sequência controle Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figura 6), áreas de menor conservação da sequência na região promotora a montante (Figura 5) e a região intrônica (Figura 7) também foram identificadas.

[00180] As regiões promotoras a montante do promotor Ubi-1 de *Z.*

luxurians v1 mostraram variação em relação ao promotor Ubi-1 a montante de *Z. mays* c.v. B73-, tendo apenas 87,8% de homologia de sequência (Tabela 2). A maioria das diferenças identificadas na região promotora a montante de *Z. luxurians* v1 compreendiam exclusões, substituições e/ou combinações errôneas de nucleotídeos (Figura 5). Em particular, uma exclusão de 12-13 pb localizada dentro 12-13pb 5' a montante do elemento promotor caixa TATA foi encontrada no promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (pares de bases 773-784 mostrados em retângulo). Similarmente, a Figura 5 mostra dois Elementos de Choque Térmico (Heat Shock Element - HSE) sobrepostos (sequências de pares de bases 457-481 e 482-500, respectivamente, mostradas envolvidas em círculo) que não foram conservados no novo promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 analisado neste estudo.

[00181] Além disso, há outros motivos reguladores na região a montante do promotor-Ubi-1 que se estendem 100-200 pb 5' a montante do TSS. Estes motivos se ligam a fatores de transcrição que interagem com o complexo de início de transcrição e facilitam sua montagem, melhoram sua estabilidade ou aumentam a eficiência de escape do promotor uma vez que a maquinaria transcricional desativa (PEREYRA-MARTI *et al.* 2010). Assim, exclusões, substituições e combinações errôneas dentro desta região reguladora, tal como observado no promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (Figura 5), podem afetar potencialmente tanto a intensidade quanto a especificidade do promotor.

[00182] Variação de sequência também foi identificada nas regiões intrônicas do promotor Ubi-1 de *Z. luxurians*. Embora o novo promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 compartilhe níveis relativamente conservados de identidade de sequência (isto é, 91,7%) com a sequência do promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 de controle (Tabela 2), a sequência intrônica do promotor de *Z. luxurians* v1 também continha duas exclusões significativas de aproximadamente 17 pb e 8 pb, respectivamente

(Figura 7) que não foram identificadas na sequência de controle. A exclusão de 17 pb estava localizada a aproximadamente 195 pb 3' a jusante do TSS (pares de bases 120-136, mostrados no retângulo) e a exclusão de 8 pb estava localizada aproximadamente 710 pb 3' a jusante do TSS (pares de bases 626-633, mostrados sublinhados).

Exemplo 3: Construção de vetor de expressão gênica usando os novos promotores

[00183] Salvo indicação em contrário, as manipulações bioquímicas e biológicas moleculares descritas neste e nos Exemplos subsequentes foram realizadas por meio de metodologias convencionais conforme descrito, por exemplo, em Ausubel *et al.* (1995) e Sambrook *et al.* (1989) e atualizações dos mesmos. Os construtos usados nos experimentos são descritos em maiores detalhes abaixo (Tabela 3).

[00184] O promotor de *Z. luxurians* que compreende o promotor a montante, 5'-UTR e regiões intrônicas, conforme descrito anteriormente, foi extraído do gene Ubi-1 de espécies *Z. luxurians* e os amplicons de PCR foram purificados em gel usando QIAquick Gel Extraction Kit® (Qiagen Carlsbad, CA). A sequência de polinucleotídeo do promotor foi, então, clonada em um Gateway Entry Vector® (Invitrogen) usando métodos de clonagem convencionais conhecidos na técnica. O Gateway Entry Vector® resultante compreendendo a sequência do promotor Ubi-1 para *Z. luxurians* v1 foi confirmado através de digestão por restrição e sequenciamento. Um vetor de entrada de controle comprendendo a sequência do promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 também foi clonado em um Gateway Entry Vector® usando métodos de clonagem convencionais na técnica.

[00185] Além das sequências promotoras Ubi-1, o vetor de entrada também compreendia o gene repórter *proteína fluorescente amarela* da espécie *Phialidium* (*PhiYFP*; Shagin, D. A., (2004) *Mol Biol Evol.* 21; 841-50), com um íntron ST-LS1 incorporado na sequência (Van-

canneyt, G., (1990) *Mol Gen Genet.* 220; 245-50) e a região 3'-UTR do gene de peroxidase 5 de *Zea mays* (*ZmPer5*; Patente dos Estados Unidos N° 6.699.984). Mapas de vetores mostrando os vetores de entrada clonados compreendendo cada uma das sequências promotoras são fornecidos. O construto pDAB105742 corresponde ao vetor de entrada de controle que compreende a sequência promotora Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73. O construto pDAB105737 corresponde ao vetor de entrada compreendendo a sequência promotora de *Z. luxurians* v1. Assim, vetores de entrada que compreendem cassetes de expressão gênica compreendendo um promotor Ubi-1 de uma espécie *Zea*, o gene *PhiYFP* e a 3'-UTR *ZmPer5* foram estabelecidos.

[00186] Conforme descrito na Tabela 3, um construto de vetor de expressão binário compreendendo o gene repórter *PhiYFP* comandado pela nova sequência promotora e terminado pela 3'-UTR *ZmPer5* foi construído. Vetores de transformação ou expressão para transformação de embriões de milho mediada por *Agrobacterium* foram construídos usando métodos de clonagem convencionais e reações de recombinação Gateway® empregando um vetor de destino binário convencional, pDAB101917, e os vetores de entrada compreendendo os cassetes de expressão gênica conforme descrito acima.

[00187] O vetor de destino binário, pDAB101917, compreendia um gene de tolerância a herbicida, *acetiltransferase de fosfinotricina* (PAT; Wehrmann *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278). No vetor pDAB101917, expressão do gene PAT estava sob o controle de um promotor Ubi-1, 5'-UTR e ítron de *Z. mays*. O vetor pDAB101917 também compreendia uma região 3'-UTR do gene de lipase de *Z. mays* (*ZmLip*; Patente dos Estados Unidos N° 7.179.902). A 3'-UTR *ZmLip* foi usada para terminar a transcrição do mRNA de PAT. A reação de recombinação Gateway® permitiu a inserção de cada vetor de entrada compreendendo o cassete de expressão gênica (isto é, um

promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 ou *Z. luxurians* v1, o gene *PhYFP* e a 3'-UTR *ZmPer5*) no vetor de destino binário pDAB101917. Os vetores de entrada foram inseridos no vetor de destino pDAB101917 entre as bordas de T-DNA A e B e a montante do cassete de expressão de PAT.

Tabela 3: Construção de vetor de expressão gênica binário							
	Construto de vetor de entrada			Construto de vetor de destino			
Construto de vetor binário	Promotor	Transgene	3'-UTR	Promotor	Gene repórter	3'-UTR	Figura
pDAB105748	Ubi-1 de <i>Z. mays</i> c.v. B73	<i>PhYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	Ubi-1 de <i>Z. mays</i>	PAT	<i>ZmLip</i>	8
pDAB105743	Ubi-1 de <i>Z. luxurians</i> v1	<i>PhYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	Ubi-1 de <i>Z. mays</i>	PAT	<i>ZmLip</i>	9

[00188] Mapas de vetores mostrando o construto de expressão binário, pDAB101917, com os cassetes de expressão gênica compreendidos de um promotor Ubi-1 de *Z. mays* ou *Z. luxurians*, o gene *PhYFP* e a 3'-UTR *ZmPer5* incorporados são fornecidos. O construto de controle, pDAB105748, corresponde ao cassete de expressão gênica compreendendo o promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 (Figura 8). Além disso, o construto pDAB105743 corresponde ao cassete de expressão gênica compreendendo a sequência do promotor Ubi-1 de *Z. luxurians* v1 (Figura 9).

Exemplo 4: Transformação de Plantas

[00189] Construtos de vetor binário, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73) e pDAB105743 (*Z. luxurians* v1) foram, cada um, transformados na cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, EHA101, usando métodos convencionais de transformação conhecidos na técnica. Colônias bacterianas foram isoladas e o plasmídeo de DNA binário foi extraído, purificado e confirmado através de digestão com enzimas de restrição.

[00190] Transformação de plantas de milho foi feita de acordo com o protocolo descrito em Vega et al, 2008, Plant Cell Rep. 27: 297-305 o qual emprega transformação mediada por *Agrobacterium* e o gene de *acetiltransferase de fosfinotricina* (PAT; Wehrmann et al., 1996, Nature Biotechnology 14: 1274-1278) como um marcador selecionável em planta. Culturas de *Agrobacterium tumefaciens* compreendendo os construtos de vetores binários (descritos acima) foram usadas para transformar plantas *Z. mays* c.v. Hi-II e produzir eventos de milho transgênico no primeiro round, T₀ (Tabela 4). Os embriões zigóticos imaturos foram produzidos, preparados e colhidos 2,5 meses após transformação.

[00191] Resultados de transformação para os construtos de expressão gênica individuais são ainda descritos na Tabela 4. O número total de embriões produzidos, o número total de eventos transgênicos observados no estágio de caule e na planta inteira, bem como a percentagem de eficiência global de transformação são descritos. A eficiência global de transformação dos construtos de expressão binários é menor do que previamente reportado (Vega et al., 2008) em virtude ao fraco vigor dos embriões em vários experimentos.

Tabela 4: Primeiro ciclo, T₀, resultados de transformação de milho				
Construto de Vetor binário	Total # Embriões	Número de caule	Número de eventos transgênicos	Eficiência (%)
pDAB105748	545	221	33	6,1
pDAB105743	632	228	28	4,4

Exemplo 5: Análise de Número de Cópias de Transgene

[00192] A integração estável do transgene *PhYFP* dentro do genoma das plantas *Z. mays* transgênicas foi confirmada por meio de um ensaio de sonda de hidrólise. Plântulas *Z. mays* transgênicas estavelmente transformadas que se desenvolveram a partir de caule foram obtidas e analisadas para identificar eventos que continham um baixo número de cópias (1-2 cópias) de insertos de T-fita de comprimento total.

[00193] O sistema Roche Light Cycler480™ foi usado para determinar o número de cópias do transgene. O método utilizou uma reação TaqMan® bplex que empregou oligonucleotídeos específicos para o gene *yfp* e o gene de referência endógeno de *Z. mays*, *invertase* (Acesso Genbank Nº U16123.1), em um único ensaio. O número de cópias e zigosidade foram determinados medindo-se a intensidade de fluorescência *yfp*-específica em relação à fluorescência *invertase*-específica, quando comparado com padrões de número de cópias conhecidos.

[00194] Um fragmento de DNA gene *PhiYFP*-específico foi amplificado com um conjunto de iniciador/sonda para TaqMan® contendo uma sonda marcada com corante fluorescente FAM™ e *ZmInv* foi amplificado com um segundo conjunto de iniciador/sonda para TaqMan® contendo uma sonda marcada com fluorescência HEX™ (Tabela 5). Iniciadores e sondas para análise do número de cópias foram comercialmente sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). A porção fluorescente FAM™ foi excitada em uma densidade óptica de 465/510 nm e a porção fluorescente HEX™ foi excitada em uma densidade óptica de 533/580 nm.

[00195] As reações de PCR foram preparadas em um volume final de reação de 10 µl usando reagentes conforme descrito na Tabela 6. Os fragmentos de DNA gene específicos foram amplificados de acordo com as condições de ciclo térmico apresentadas na Tabela 7. O número de cópias e zigosidade das amostras foram determinados medindo a intensidade relativa de fluorescência específica para o gene repórter, *PhiYFP*, a fluorescência específica para o gene de referência, *ZmInv*, em comparação com padrões de número de cópia conhecidos.

[00196] Os padrões foram criados através de diluição do vetor, pDAB108706, em DNA genômico de *Z. mays* B104 (gDNA) para obter padrões com uma relação conhecida de pDAB108706:gDNA. Por exemplo, amostras tendo uma; duas; e quatro cópia(s) do DNA de vetor

por uma cópia do gDNA de *Z. mays* B104 foram preparadas. Diluições de uma e duas cópias do pDAB108706 misturado com o padrão de gDNA de *Z. mays* B104 foram validadas contra um evento de *Z. mays* de controle que era conhecido por ser hemizigótico e um evento de *Z. mays* de controle que era conhecido por ser homozigótico (isto é, evento 278 de *Z. Mays*; vide Publicação de Patente Internacional PCT N°WO 2011/022469 A2).

[00197] Um ensaio TaqMan® bplex que utiliza oligonucleotídeos específicos para o gene PAT e o gene endógeno de referência, *ZmInv*, foi realizado por amplificação e detecção de um fragmento de DNA gene-específico para PAT com um conjunto de iniciador/sonda para TaqMan® contendo uma sonda marcada com corante fluorescente FAM e por amplificação e detecção de o gene endógeno de referência/controle *ZmInv* (Tabela 5). A mistura de reação para TaqMan® de PAT foi preparada conforme descrito na Tabela 6 e os fragmentos específicos foram amplificados de acordo com as condições apresentadas na Tabela 7.

[00198] Os resultados da análise do número de cópias do transgene nas plantas transgênicas obtidas através de transformação com diferentes construtos de promotor são mostrados na Tabela 8. Apenas plantas com 1-2 cópias do transgene *PhYFP* foram transferidas para a estufa para outras análises de expressão.

Tabela 5: Iniciadores e sondas para ensaios de número de cópias

Gene	Iniciador/Sonda	Sequência de nucleotídeos	SEQ ID No:
<i>PhYFP</i>	Iniciador direto	CGTGTGGAAAGAACTTGGA	11
	Iniciador reverso	CCGTGGTTGGCTTGGTCT	12
	Sonda (marcador fluorescente/sequência)	5'FAM/CACTCCCCACTGCCT	13
<i>ZmInv</i>	Iniciador Direto	TGGCGGACGACGACTTGT	14
	Iniciador reverso	AAAGTTGGAGGCTGCCGT	15
	Sonda (marcador fluorescente/sequência)	5'HEX/CGAGCAGACCGCCGTGTAC TT	16

Tabela 5: Iniciadores e sondas para ensaios de número de cópias			
Gene	Iniciador/Sonda	Sequência de nucleotídeos	SEQ ID No:
PAT	Iniciador direto	ACAAGAGTGGATTGATGATCTA-GAGAGGT	17
	Iniciador reverso	CTTGATGCCTATGTGACACGTA-AACAGT	18
	Sonda (marcador fluorescente/sequência)	5'FAM/GGTGTTGGCTGGTATTG CTTACGCTGG	19

Tabela 6: Reagentes para reação de PCR para número de cópias Taqman®				
Reagente	Concentração de trabalho	Volume (μl)	Concentração final	
Água	--	0,5	--	
Roche LightCycler Master Mix	2X	5	1X	
Iniciador direto <i>PhYFP</i>	10 μM	0,4	400 nM	
Iniciador reverso <i>PhYFP</i>	10 μM	0,4	400 nM	
Sonda <i>PhYFP</i> marcada com FAM	5 μM	0,4	200 nM	
Iniciador direto <i>Zmlnv</i>	10 μM	0,4	400 nM	
Iniciador reverso <i>Zmlnv</i>	10 μM	0,4	400 nM	
Sonda <i>Zmlnv</i> marcada com HEX	5 μM	0,4	200 nM	
Polivinilpirrolidona (PVP)	10%	0,1	0,10%	
Modelo de DNA genômico	~5 ng/μl	2	10 ng/μl	

Tabela 7: Condições de ciclo térmico para amplificação por PCR para número de cópias			
Etapa de PCR	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
1	95	10 minutos	1
2	95	10 segundos	
	58	35 segundos	
	72	1 segundos	
3	40	10 segundos	1

Tabela 8: Análise de número de cópias de transgene de plantas transgênicas			
Construto	Eventos analisados	Simples (1-2 cópias)	Complexos (>2 cópias)
105748	21	15	6
105743	22	4	18

Exemplo 6: Quantificação por ELISA de *Phi*YFP e Proteínas PAT

[00199] As plantas foram colhidas no estágio de desenvolvimento V4-5 usando ensaios ELISA de folhas. As amostras foram coletadas em placas com tubos de coleta com 96 cavidades e 4 discos de folhas (tamanho de um furo feito com um perfurador de papel) foram tomadas para cada amostra. Dois BBs de 4,5 mm (Daisy Corporation, Roger, AR) e 200 µL de tampão de extração [1x PBS suplementado com Tween-20 a 0,05% e BSA a 0,05% (Millipore Probumin®, Merck Millipore Corp., Billerica, MA)] foram adicionados cada tubo. Mais 200 µL de tampão de extração foram adicionados a cada tubo seguido de inversão para misturar. As placas foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para cavidades correspondentes em uma placa com 96 cavidades profundas armazenada em gelo. Placas Nunc® 96-well Maxi-Sorp (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) foram usadas para ELISA. As placas foram revestidas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-YFP para captura (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD). O anticorpo foi diluído em PBS (1 µg/mL) e 150 µL de PBS foram adicionados por cavidade. As placas foram incubadas durante a noite a 4 °C. As placas foram mantidas durante a noite em temperatura ambiente durante 20-30 minutos antes de lavagem 4x com 350 µL de tampão de lavagem [1x PBS suplementado com Tween-20 a 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)].

[00199] As placas foram bloqueadas com 200 µL por cavidade de tampão de bloqueio [1x PBS suplementado com Tween-20 a 0,05% + BSA a 0,5% (Millipore Probumin®)] durante um período mínimo de 1 hora a + 37 °C, seguido por lavagem com 4 x 350 µL de tampão de lavagem (Tomtec QuadraWash™ 2, Tomtec, Inc., Hamden, CT).

[00200] Para o ELISA de YFP, Phi-YFP recombinante Evrogen a 1 mg/mL (Axxora LLC, Farmingdale, NY) foi usado como um padrão. Uma curva padrão de adaptação com 5 parâmetros (entre os padrões

de 1 ng/ml e 0,125 ng/ml) foi usada para assegurar que todos os dados caíssem na porção linear da curva. 100 µL de padrão ou amostra foram adicionados à cavidade. Uma diluição mínima de 1:4 de amostra no Tampão de Ensaio foi usada. As placas foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente em um agitador de placas (250 rpm; Titer Plate Shaker), seguido por lavagem com 4 x 350 µL de tampão de lavagem (Tomtec QuadraWash™ 2). Cerca de 100 µL de anticorpo primário policlonal de coelho anti-PhiYFP Evrogen a 1 µg/mL (Axxora) foram adicionados a cada cavidade. As placas foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente sobre um agitador de placas a 250 rpm, seguido por uma lavagem com 4 x 350 µL de tampão de lavagem (Tomtec QuadraWash™ 2). Em seguida, 100 µL de anticorpo secundário anti-IgG HRP de coelho (Thermo Scientific) diluído a 1:5000 em tampão de bloqueio/ensaio aos quais proteínas PAT foram adicionadas usando um kit da Envirologix (Portland, ME). Os ELISAs foram realizados usando múltiplas diluições de extratos de plantas e os reagentes e instruções essencialmente conforme fornecido pelos fornecedores.

Exemplo 7: Expressão Estável em Planta de Transgene Operativamente Ligado a Novos Promotores

[00201] Expressão de proteínas foi observada em tecidos de plantas transgênicas. Por exemplo, expressão de *PhiYFP* foi observada em caules de plantas T₀ que foram transformadas de forma estável por meio de cocultura com *Agrobacterium*. As plantas transgênicas foram cultivadas a partir de embriões transformados de *Z. mays* usando os construtos de vetores binários compreendendo o novo promotor, pDAB105743 (*Z. luxurians* v1, Figura 9) e o promotor de controle, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, Figura 8). Os caules de plantas foram observados sob microscópio estereoscópico (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) usando um filtro de YFP e uma fonte de luz de 500 nm.

Exemplos representativos da expressão estável de *PhYFP* observada no tecido de caules das plantas de milho transgênicas T₀ compreendendo pDAB105743 em comparação com o controle, pDAB105748, são mostrados na Figura 10. Os dados confirmam que o novo promotor que comprehende pDAB105743 (*Z. luxurians* v1), conforme descrito aqui, é capaz de comandar expressão robusta do gene *PhYFP* em tecido de caule de plantas transgênicas T₀.

[00202] Conforme descrito na Tabela 8, plantas inteiras que continha um baixo número de cópias (isto é, 1-2 cópias) do transgene *PhYFP* foram cultivadas em uma estufa. Em geral, cerca de cinco (5) a cerca de dez (10) eventos por construto e cerca de cinco (5) plantas foram usados para análise de expressão T₁. Os dados de ELISA revelaram expressão consistente da proteína *PhYFP* nas folhas de plantas de milho T₁ usando construtos de vetores comprendendo o novo promotor, pDAB105743 (*Z. luxurians* v1), em comparação com o construto de controle, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73).

[00203] Uma expressão média de proteína *PhYFP* de aproximadamente 142,5 ng/mg (+/- 35,9 ng/mg) de *PhYFP* foi observada para as plantas T₁ que comprehendem o novo construto promotor, pDAB105743 (*Z. luxurians* v1, Figura 9), em comparação com aproximadamente 285,3 ng/mg (+/- 22,7 ng/mg) de proteína *PhYFP* produzida pela planta de controle comprendendo o construto de controle, pDAB105748 (*Z. mays* c.v. B73, Figura 8). Estes resultados confirmam que o novo promotor de *Z. luxurians* v1, conforme descrito aqui, foi útil na produção de traços transgênicos com altos níveis de produção de proteína.

[00204] Além disso, expressão média de PAT para todas as plantas T₁ compreendendo pDAB105743 (*Z. luxurians* v1) foi de cerca de 59,0 ng/mg (+/- 11,6 ng/mg) em comparação com cerca de 105,8 ng/mg (+/- 7,4 ng/mg) de proteína PAT produzida pela planta de controle com-

preendendo pDAB105748 do promotor de *Z. mays* c.v. B73. Em geral, a expressão da proteína PAT para todas as plantas de milho foi significativamente menor do que a expressão observada para os genes *PhiYFP* em plantas de milho.

[00205] Expressão da proteína *PhiYFP* também foi medida em pólen derivado de pendões de plantas transgênicas T₁ selecionadas representando cada uma dos construtos dos novos promotores descritos aqui. Conforme mostrado na Figura 11, análise de imagem do pólen transgênico confirma que o novo promotor que compreende pDAB105743 (*Z. luxurians* v1), conforme descrito no presente Pedido de patente, comanda alta expressão de proteína *PhiYFP* em pólen.

Exemplo 8: Construção de Vetor

[00206] O constructo de vetor de expressão binário pDAB112853 é mostrado na Figura 12. O construto pDAB112853 compreendia o gene repórter *PhiYFP* e a 3'-UTR *ZmPer5*, os quais foram comandados por um promotor *ZmUbi-v2*. O construto pDAB112853 também compreendia o gene *AAD-1 v3* e a 3'-UTR *ZmLip v1*, os quais eram comandados por *Z. luxurians* v1.

[00207] O construto pDAB112853 foi criado usando metodologias convencionais, conforme descrito, por exemplo, Ausubel *et al.* (1995), Sambrook *et al.* (1989) e atualizações dos mesmos. Vetores de transformação ou expressão para a transformação de embriões de milho mediada por *Agrobacterium* foram construídos usando métodos de clonagem convencionais e reações de recombinação Gateway® empregando um vetor binário de destino e vetor de entrada convencionais compreendendo os cassetes de expressão gênica conforme descrito acima.

Exemplo 9: Expressão Estável de Plantas Transgênicas Operativamente Ligadas a Novos Promotores

[00208] Plantas inteiras que continham um baixo número de cópias

(ou seja, 1-2 cópias) do transgene *PhYFP* foram cultivadas em uma estufa. Dezenove (19) eventos foram usados para análise de expressão T₀, conforme mostrado na Tabela 9 (abaixo). Expressão robusta de proteína *AAD1* foi obtida a partir de todos os eventos analisados (vide Tabela 9).

[00209] Plantas T₀ com uma única cópia de transgene foram retrocruzadas com plantas de milho B104 de tipo selvagem para obter sementes T₁. Hemizigóticas plantas T₁ foram usadas para análise. Três (3) eventos por construto e cinco (5) plantas por evento foram analisadas quanto à expressão em folha R3. Três eventos (3) foram usados para outro tipo de expressão tecidual.

[00210] Medidas quantitativas da proteína *AAD1* obtida a partir de tecido foliar de plantas transgênicas T₁ que compreendem novos construtos promotores são mostradas na Tabela 10 (abaixo). Os dados da Tabela 10 confirmaram os resultados de expressão em folhas T₀ (vide Tabela 9) e mostraram ainda expressão consistentemente alta de proteína *AAD1* em folhas R3 e outros tecidos que são obtidos de plantas que contêm os novos promotores descritos aqui.

Tabela 9: Expressão de proteína *AAD1* em Folhas V4 T₀

#	Evento	Proteína <i>AAD1</i> (ng/cm ²)
1	112853[1]-001,001	45,7
2	112853[1]-006,001	42,4
3	112853[1]-007,001	34,9
4	112853[1]-008,001	47,9
5	112853[1]-009,001	62,0
6	112853[1]-010,001	168,9
7	112853[1]-012,001	142,7
8	112853[1]-013,001	127,0
9	112853[1]-014,001	26,5

Tabela 9: Expressão de proteína AAD1 em Folhas V4 T₀		
#	Evento	Proteína AAD1 (ng/cm ²)
10	112853[1]-015,001	59,3
11	112853[2]-016,001	49,3
12	112853[2]-019,001	80,5
13	112853[2]-020,001	68,9
14	112853[2]-022,001	40,3
15	112853[2]-025,001	62,9
16	112853[2]-027,001	50,5
17	112853[2]-028,001	76,3
18	112853[2]-029,001	55,8
19	112853[2]-030,001	72,5

Tabela 10: Expressão de proteína AAD1 em diferentes tipos de tecidos de plantas T₁								
Evento	AAD-1 média (ng/mg)							
	Sabugo	Casca	Grão	Pólen	Folha R3	Raiz	Pelos	Caule
112853[1]-001	2004,3	769,1	689,7	1134,9	824,7	1731,7	1765,5	2851,3
112853[2]-019	1542,8	672,4	896,6	859,8	776,9	2078,0	2174,5	3551,4
112853[2]-020	1725,7	1015,5	625,9	591,2	556,0	1738,0	2203,7	2838,7

REIVINDICAÇÕES

1. Cassete de expressão gênica, caracterizado pelo fato de que compreende um promotor operacionalmente ligado a um transgene, em que o promotor compreende um polinucleotídeo com pelo menos 90% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 2, em que o cassete de expressão gênica satisfaz pelo menos um dentre os seguintes itens:

(i) o promotor hibridiza, sob condições rigorosas, com uma sonda de polinucleotídeo compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com um complemento de SEQ ID NO: 2,

(ii) o transgene operacionalmente ligado codifica um polipeptídeo ou pequeno RNA,

(iii) o transgene é selecionado dentre o grupo que consiste em um transgene de resistência a inseticida, um transgene de tolerância a herbicida, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA e um transgene de marcador selecionável,

(iv) o cassete de expressão gênica compreende ainda uma região 3' não traduzida.

2. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o cassete de expressão gênica, como definido na reivindicação 1, em que opcionalmente o vetor é selecionado dentre o grupo que consiste em um plasmídeo, um cosmídeo, um cromossomo bacteriano artificial, um vírus e um bacteriófago.

3. Método para expressão de uma sequência codificante heteróloga em uma planta transgênica, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) transformação de uma célula de planta com um cassete de expressão gênica compreendendo uma sequência de polinucleotí-

deo que comprehende SEQ ID NO: 2 operacionalmente ligada à sequência codificante heteróloga, a qual está operacionalmente ligada a uma região 3' não traduzida;

(b) isolamento de uma célula de planta transformada compreendendo o cassete de expressão gênica;

(c) regeneração da célula de planta transformada em uma planta transgênica; e

(d) obtenção de uma planta transgênica, em que a planta comprehende o cassete de expressão gênica compreendendo a sequência de polinucleotídeo que comprehende SEQ ID NO: 2,

em que o método opcionalmente inclui pelo menos um dos seguintes itens:

(i) a sequência codificante heteróloga é selecionada dentre o grupo que consiste em uma sequência que codifica a resistência a inseticida, uma sequência que codifica a tolerância a herbicidas, uma sequência que codifica a eficiência de uso de nitrogênio, uma sequência que codifica a eficiência de uso de água, uma sequência que codifica a qualidade nutricional, uma sequência que codifica a ligação a DNA, e uma sequência que codifica um marcador selecionável,

(ii) a transformação de uma célula de planta é um método de transformação de plantas, em que opcionalmente o método de transformação de plantas é selecionado dentre o grupo que consiste em um método de transformação mediada por *Agrobacterium*, um método de transformação por biolística, um método de transformação com carboneto de silício, um método de transformação de protoplastos, e um método de transformação de lipossomo,

(iii) a planta transgênica é uma planta transgênica monocotiledônea ou dicotiledônea, em que opcionalmente a planta monocotiledônea é selecionada dentre o grupo que consiste em uma planta de milho, uma planta de trigo e uma planta de arroz,

(iv) a sequência codificante heteróloga é expressa em um tecido de planta transgênica,

(v) o tecido de planta transgênica é um tecido de raiz, folha, caule ou pólen da planta transgênica.

4. Método para o isolamento de uma sequência de polinucleotídeo compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com SEQ ID NO: 2, caracterizado pelo fato de que comprehende:

(a) identificação da sequência de polinucleotídeo compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com SEQ ID NO: 2;

(b) produção de uma pluralidade de sequências de iniciadores de oligonucleotídeo, em que as sequências de iniciadores de oligonucleotídeo se ligam à sequência de polinucleotídeo compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com SEQ ID NO: 2;

(c) amplificação da sequência de polinucleotídeo compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com SEQ ID NO: 2 a partir de uma amostra de DNA com sequências de iniciadores de oligonucleotídeo selecionadas dentre a pluralidade de sequências de iniciadores de oligonucleotídeo; e

(d) isolamento da sequência de polinucleotídeo compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com SEQ ID NO: 2,

em que opcionalmente a sequência de polinucleotídeo isolada compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com SEQ ID NO: 2 está operacionalmente ligada a um transgene, em que opcionalmente o transgene operacionalmente ligado codifica um polipeptídeo ou um pequeno RNA.

5. Sequência de polinucleotídeo purificada, caracterizada pelo fato de que comprehende pelo menos 90% de identidade de se-

quênciam com SEQ ID NO: 2, em que a sequência de polinucleotídeo purificada promove a expressão de um transgene, em que a sequência de polinucleotídeo purificada opcionalmente satisfaz pelo menos um dos seguintes itens:

(i) uma sequência de sonda de polinucleotídeo compreendendo uma identidade de sequência de pelo menos 90% com o complemento de SEQ ID NO: 2 hibridiza, sob condições rigorosas, com a sequência de polinucleotídeo purificada,

(ii) a sequência de polinucleotídeo purificada está operacionalmente ligada a um transgene, em que opcionalmente o transgene operacionalmente ligado codifica um polipeptídeo.

6. Cassete de expressão gênica, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de polinucleotídeo purificada operacionalmente ligada ao transgene, como definida na reivindicação 5, a qual está operacionalmente ligada a uma região 3' não traduzida, em que opcionalmente o transgene é selecionado dentre o grupo que consiste em um transgene de resistência a inseticidas, um transgene de tolerância a herbicidas, um transgene de eficiência de uso de nitrogênio, um transgene de eficiência de uso de água, um transgene de qualidade nutricional, um transgene de ligação a DNA, e um transgene de marcador de expressão selecionável.

7. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende um cassete de expressão gênica, como definido na reivindicação 6, em que opcionalmente o vetor é selecionado dentre o grupo que consiste em um vetor de plasmídeo, um vetor de cosmídeo e um vetor BAC.

8. Invenção, caracterizada por quaisquer de suas concretizações ou categorias de reivindicação englobadas pela matéria inicialmente revelada no pedido de patente ou em seus exemplos aqui apresentados.

FIG. 1

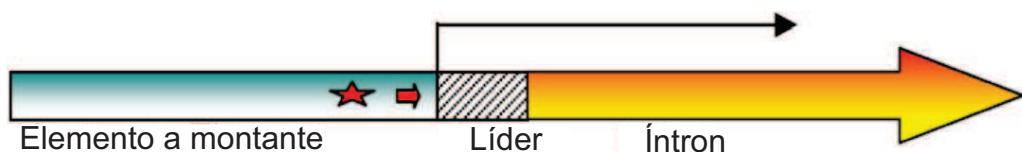


FIG. 2

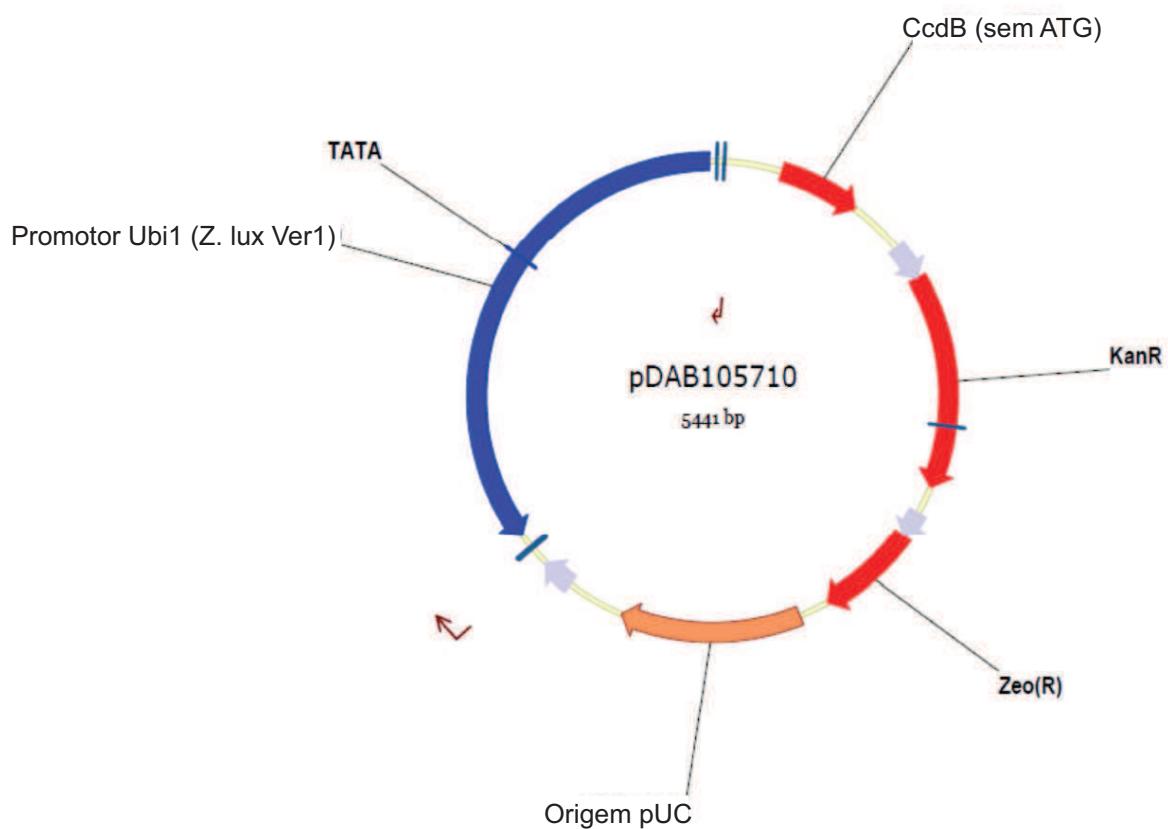


FIG. 3

FIG. 4

FIG. 5

Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(1)	1	35
	(1)	-----	
		GACCCGGTCGTGCCCCCTCTCTAGAGA	
		36	70
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(36)	TAA	70
	(27)	TAA	70
		GAGCATTGCATGTCATAAGTATAAAAAATTA	
		71	105
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(71)	CCACATATTTTTT	105
	(62)	TGTCACACTTG	
		CCACATATTTTTT	
		-CGCACACTTA	
		TTTA	
		AAGTGC	
		106	140
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(106)	AGTTTATCTATCT	140
	(96)	TTTATCTATCT	
		TATACACATATATTTAAACTTAA	
		141	175
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(141)	CTCTACG	175
	(131)	AATAATATA	
		ATCTATAGTACTA	
		ATAAA	
		176	210
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(176)	TATCAGTGTAGA	210
	(166)	GAA	
		CATATAAAATGAAC	
		ACT	
		211	245
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(211)	TAGACATGGTCTAAAC	245
	(201)	GACAA	
		TTGAGTATTT	
		TGAC	
		246	280
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(246)	AACAGGACTCTACAGTTTATCTTTTAGTGTGCA	280
	(235)	AACAGGACTCTACAGTTTATCTTTTAGTGTGCA	
		281	315
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(281)	TGTGTTCTC	315
	(270)	C-----	
		TTTTTTTTTG	
		CAAATAGCTT	
		316	350
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(312)	ACCTATATAAACTTCATCCATT	350
	(305)	TATTAGTACAT	
		351	385
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(347)	CCATT	385
	(340)	TAGGGTT	
		ATGGTTT	
		TATAGAC	
		386	420
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(382)	TAATTTTT	420
	(375)	TAGTACATCTATTTATT	
		CTA	
		TTTTA	
		421	455
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(417)	GCCT	455
	(408)	TAAATTAAGAAA	
		ACTA	
		AAACTCTATTTAG	
		456	490
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(452)	T-----	490
	(443)	TTTTTATTTAA	
		AGTTAGATATAAAATAGAAT	
		491	525
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(487)	AAAAAAAGTG	525
	(445)	ACTAA	
		AAATTAAACAAATACCC	
		TT	
		526	560
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(522)	TAAGA	560
	(469)	AAATTAAACCAAGGAAAC	
		TTTTCTT	
		561	595
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(557)	GTTCGAGTAGAT	595
	(504)	ATGC	
		CAGCCTGTT	
		AAACGCCG	
		596	630
Z. mays c.v. B73 a montante Z. luxurians v1 a montante	(592)	TCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAAC	630
	(539)	CG	
		631	665

FIG. 5 continuação

Z. mays c.v. B73 a montante	(627)	CAGCGTCGGCTCGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC
Z. luxurians v1 a montante	(574)	CAGCGTCGGCTCGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC
	666	700
Z. mays c.v. B73 a montante	(662)	GGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG
Z. luxurians v1 a montante	(609)	GGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG
	701	735
Z. mays c.v. B73 a montante	(697)	AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTGG
Z. luxurians v1 a montante	(644)	AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTGG
	736	770
Z. mays c.v. B73 a montante	(732)	GCATCCAGAAATGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTG
Z. luxurians v1 a montante	(679)	GCATCCAGAAAGCGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTG
	771	805
Z. mays c.v. B73 a montante	(767)	AGCGGGCACGGCAGCGGGCCTCCTCCCTCTCAC
Z. luxurians v1 a montante	(714)	AG-----CGGGCCTCCTCCCTCTCAC
	806	840
Z. mays c.v. B73 a montante	(802)	GGCACCGGCAGCTACGGGGATTCCCTTCCCACCG
Z. luxurians v1 a montante	(737)	GGCACCGGCAGCTACGGGGATTCCCTTCCCACCG
	841	875
Z. mays c.v. B73 a montante	(837)	CTCCTTCGCTTCCCTTCCTCGCCCCGCCGTAAATAA
Z. luxurians v1 a montante	(772)	CTCCTTCGCTTCCCTTCCTCGCCCCGCCGTAAATAA
	876	900
Z. mays c.v. B73 a montante	(872)	ATAGACACCCCCCTCCACACCCCTCTT
Z. luxurians v1 a montante	(807)	ATAGACACCCCCCTCCACACCCCTCTT

FIG. 6

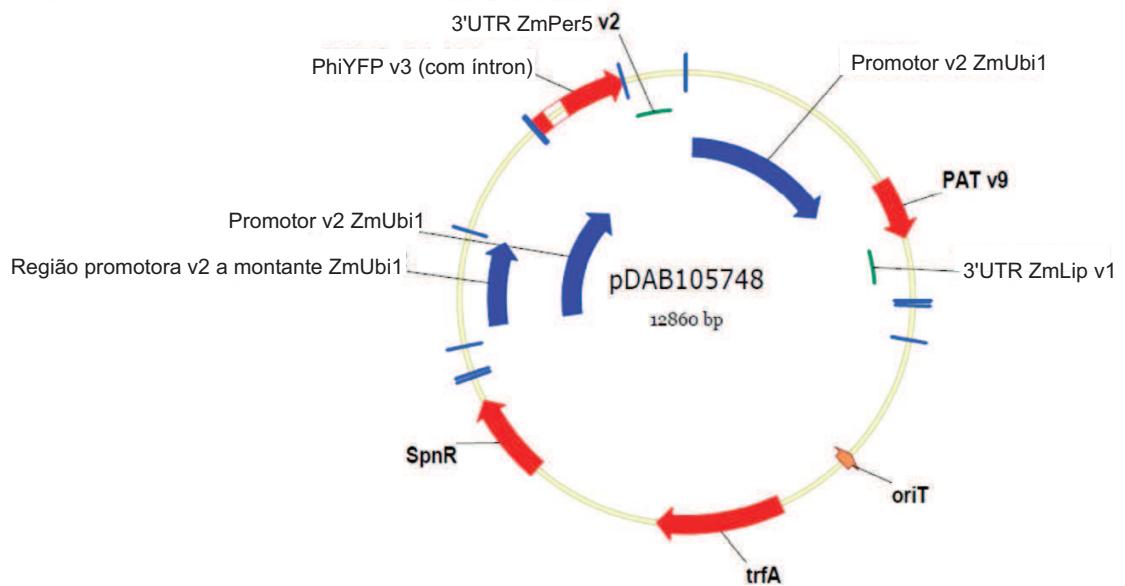
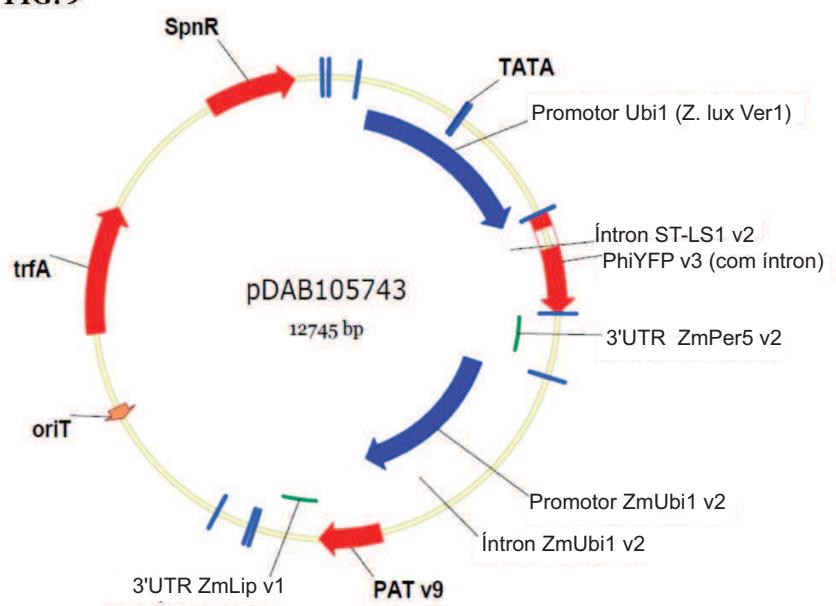
5'UTR de Z. luxurians v1	(1)	1	4 0
5'UTR de Z. mays c.v. B73	(1)	TCCCCAACCTCGTGT	TGTTGGAGCGCACACACACACAA
5'UTR de Z. luxurians v1	(41)	41	8 0
5'UTR de Z. mays c.v. B73	(40)	CCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTC	CCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTC
5'UTR de Z. luxurians v1	(81)	81	
5'UTR de Z. mays c.v. B73	(80)	AAG	

FIG. 7

Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	1	35
(1) GTACGCCGCTCA	TCCTCCCCCCCCC	TCTC
(1) GTACGCCGCTCG	TCCTCCCCCCCCC	CCCCCTCTC
36	70	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(30) TACCTTCTCTAGATCGGC	AA TCCGGTCCATG
(36)	TACCTTCTCTAGATCGGC	GT TCCGGTCCATG
71	105	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(61) GTTAGGGCCCCA	TAGTTCTACTTCTGTTCATGTT
(71)	GTTAGGGCCCCG	TAGTTCTACTTCTGTTCATGTT
106	140	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(96) GTGTTAGATCCGTC	-----
(106)	GTGTTAGATCCGTC	TTTGTGTTAGATCCGTC
141	175	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(114) TAGCGTTCTGTA	CACAGGATGCGACCTGTACATCAGA
(141)	TAGCGTTCTGTA	CACAGGATGCGACCTGTACGTCA
176	210	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(149) CACGTTCTGATTGCTA	ACTTGCCAGTGTTCCTCTT
(176)	CACGTTCTGATTGCTA	ACTTGCCAGTGTTCCTCTT
211	245	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(184) TGGCGAATCCA	AGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAG
(211)	TGGCGAATCCA	AGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAG
246	280	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(219) ACGGGATCGATTTC	CATGATTTTTTTGTTCTGTTCTGTT
(246)	ACGGGAATCGATTTC	CATGATTTTTTTGTTCTGTTCTGTT
281	315	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(254) CA	TAGGGTTGGTTTGCCCTTTCCTTTATTC
(281)	CA	TAGGGTTGGTTTGCCCTTTCCTTTATTC
316	350	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(289) CT	TATATGCTGTA
(314)	AA	CACTC
351	385	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(323) G	TCATGCTT
(349)	T	CTTTAA
386	420	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(358) C	TCTGGTTGGCGGTCTAGATCGGAGTAGAA
(384)	G	TCTGGTTGGCGGTCTAGATCGGAGTAGAA
421	455	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(393) T	TCTGTTCAAG
(419)	TT	CTACCTGGTGGATTATTAAATT
456	490	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(428) TGT	ATCTGTAC
(454)	TGG	GTGTGTGCCATACAT
491	525	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(463) TACGA	GTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCT
(489)	TACGA	ATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCT
526	560	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(498) AGGATAGGT	TACATGTTGATGCGGGTTTACTGA
(524)	AGGATAGGT	TACATGTTGATGCGGGTTTACTGA
561	595	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(533) TGCATATACAGAGATGCTTTT	TTCGCTTGGTTG
(559)	TGCATATACAGAGATGCTTTT	GTCGCTTGGTTG
596	630	
Íntron de Z. luxurians v1 Íntron de Z. mays c.v. B73	(568) TGATGATGCCGTC	TGGTTGGCGGTGTTTC
(594)	TGATGATG	TGGTGTGGTTGGCGGTGTTTC

FIG. 7 continuação

		631	665
Íntron de Z. luxurians v1	(598)	---	TAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAAC
Íntron de Z. mays c.v. B73	(629)	TTC	TAGATCGGAGTAGAATACTGTTCAAAC
		666	700
Íntron de Z. luxurians v1	(630)	TGGTGGATTATTAAATTCTGGAT	CTGTATGTGT
Íntron de Z. mays c.v. B73	(664)	TGGTGTATTATTAAATTCTGGAA	CTGTATGTGT
		701	735
Íntron de Z. luxurians v1	(665)	GCC	CATACATCTTGATAGTTACGAGTTAAGATGAT
Íntron de Z. mays c.v. B73	(699)	GT	CATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATG--
		736	770
Íntron de Z. luxurians v1	(700)	G	GATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT
Íntron de Z. mays c.v. B73	(732)	-	GATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT
		771	805
Íntron de Z. luxurians v1	(735)	CG	ATGTTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGC
Íntron de Z. mays c.v. B73	(766)	T	GATGTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGC
		806	840
Íntron de Z. luxurians v1	(770)	ATATGCAGCATCTATTCA	TATGCTCTAACCTTGAG
Íntron de Z. mays c.v. B73	(801)	ATATGCAGCATCTATTCA	TATGCTCTAACCTTGAG
		841	875
Íntron de Z. luxurians v1	(805)	TACCTATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTATA	
Íntron de Z. mays c.v. B73	(836)	TACCTATCTATTATAATAAAACAAGTATGTTTATA	
		876	910
Íntron de Z. luxurians v1	(840)	ATTATTTGAC	CTTGATATACTTGGATGATGGCAT
Íntron de Z. mays c.v. B73	(871)	ATTATTTGAT	CTTGATATACTTGGATGATGGCAT
		911	945
Íntron de Z. luxurians v1	(875)	ATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTAGCCT	TGC
Íntron de Z. mays c.v. B73	(906)	ATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTAGCCC	TGC
		946	980
Íntron de Z. luxurians v1	(910)	CTTCATACGCTATTATTGTTG	TTGGGGCTGTTTCT
Íntron de Z. mays c.v. B73	(941)	CTTCATACGCTATTATTGCTTGTA	CTGTTTCT
		981	1015
Íntron de Z. luxurians v1	(945)	TTTTGTTGAC	GCTCACCCCTGTTGTTGGTACT
Íntron de Z. mays c.v. B73	(976)	TTT-GTCGA	TGTGCTCACCCCTGTTGTTGGTACT
		1016	
Íntron de Z. luxurians v1	(980)	TCTGCA	G
Íntron de Z. mays c.v. B73	(1010)	TCTGCA	-

FIG. 8**FIG. 9**

10/11

FIG. 10

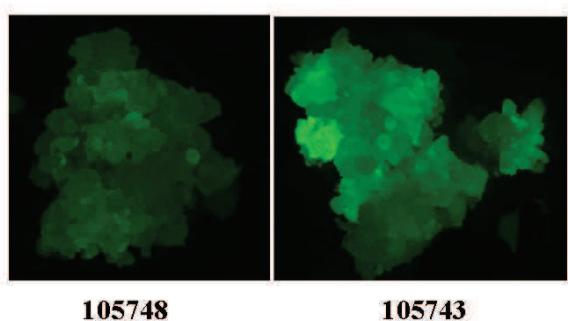


FIG. 11

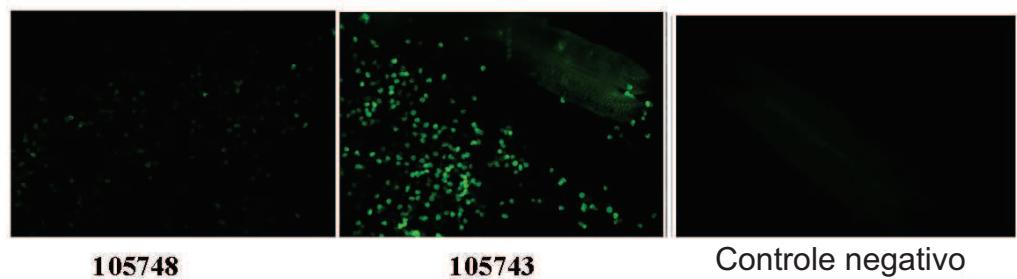
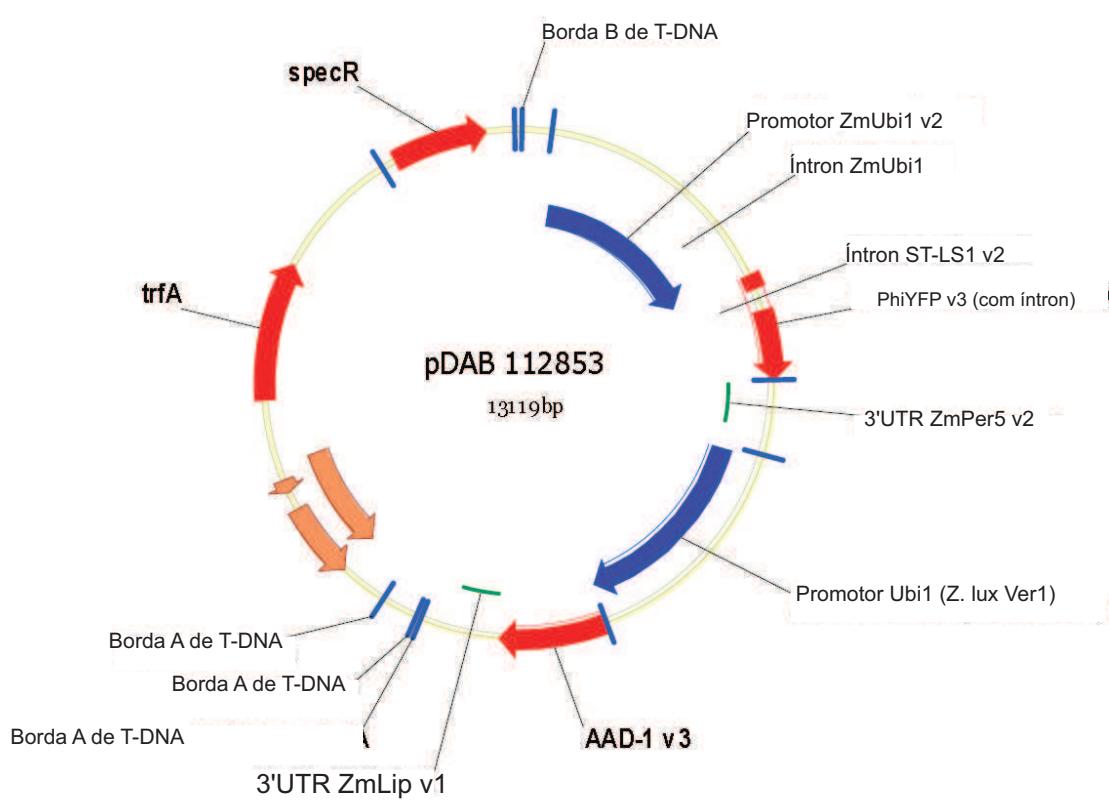


FIG. 12

RESUMO

Patente de Invenção: "**CASSETES DE EXPRESSÃO GÊNICA, VETORES RECOMBINANTES, SEQUÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO PURIFICADA, E MÉTODOS PARA EXPRESSÃO DE UMA SEQUÊNCIA CODIFICANTE HETERÓLOGA EM UMA PLANTA TRANSGÊNICA, E PARA O ISOLAMENTO DE UMA SEQUÊNCIA DE POLINUCLEOTÍDEO**".

A presente invenção refere-se ao promotor de Ubiquitina-1 de *Zea mays* c.v. B73 (Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73), que comanda altos níveis de expressão constitutiva de transgene em plantas. Uso repetido do mesmo promotor Ubi-1 de *Z. mays* c.v. B73 em construtos com múltiplos genes pode também levar ao silenciamento gênico, deste modo, tornando os produtos transgênicos menos eficazes. São fornecidos elementos promotores reguladores gênicos, construtos e métodos para expressão de um transgene em células de plantas e/ou tecidos de planta usando elementos reguladores gênicos do promotor Ubi-1 de uma espécie *Zea* diferente, *Z. luxurians* v1.

LISTAGEM DE SEQUENCIA

<110> DOW AGROSCIENCES LLC

<120> NOVOS PROMOTORES DE UBIQUITINA DE MILHO

<130> DAS-75665

<140>

<141>

<150> 61/922,529

<151> 2013-12-31

<160> 19

<170> Versao de Patente 3.5

<210> 1

<211> 1993

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 1

gtgcagcgtg acccggttgt gcccctctct agagataatg agcattgcatt gtctaagtta

60

taaaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt atctatcttt
120atacatatat ttaaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataaatatca
180gtgttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggc ctaaaggaca attgagttt
240ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttctcc tttttttttg
300caaatacgctt cacctatata atacttcattt catttttattt gtacatccat ttagggttta
360gggttaatgg tttttataga ctaatttttt tagtacatct attttattct attttagcct
420ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gtttttttat ttaatagttt agatataaaaa
480

tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaaaacta
540

aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata atgccagcct gttaaacgcc gtcgacgagt
600

ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcgc gtcgcgtcgg gccaagcgaa gcagacggca
660

cggcatctct gtcgctgcct ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg
720

ctccgctgtc ggcatccaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag
780

gcggcctcct ctcctctca cggcacccggc agctacgggg gattccttcc ccaccgctcc
840

ttcgcttcc cttcctcgcc cgccgtaata aatagacacc ccctccacac cctctttccc
900

caacctcgtg ttgttcggag cgcacacaca cacaaccaga tctccccaa atccacccgt
960

cggcacctcc gcttcaaggt acgcccgtcg tcctcccccc cccccccct ctctaccttc
1020

tctagatcggt cggtccggc catgcatggt tagggccgg tagttctact tctgttcatg
1080

tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta gogttcgtac acggatgcga
1140

cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg ggaaatcctg
1200

ggatggctct agccgttccg cagacggat cgatttcatg atttttttt tttcggtcga
1260

tagggtttgg tttgcccttt tccttattt caatatatgc cgtgcacttg tttgtcggt
1320

catctttca tgctttttt tgtctgggt gtgatgatgt ggtctgggtt ggcggtcgtt
1380

ctagatcgga gtagaattct gttcaaact acctgggttga tttattaatt ttggatctgt
1440

atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc
 1500
 taggataggt atacatgtt atgcgggttt tactgatgca tatacagaga tgcttttgt
 1560
 tcgcgggtt gtgatgatgt ggtgtggttt ggccggtcgtt cattcgttct agatcgagg
 1620
 agaatactgt ttcaaactac ctggtgttatt tattaatttt ggaactgtat gtgtgtgtca
 1680
 tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat cgatcttagga taggtataca
 1740
 tgttgatgtg ggtttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcattc tattcatatg
 1800
 ctctaaccctt gagtacccat ctattataat aaacaagtat gtttataat tatttcgatc
 1860
 ttgatatact tggatgatgg catatgcagg agctatatgt ggattttttt agccctgcct
 1920
 tcatacgcta tttatggct tggtaactgtt tctttgtcg atgctcaccc tgttgttgg
 1980
 tgttacttct gca
 1993

<210> 2
 <211> 1900
 <212> DNA
 <213> Zea luxurians

<400> 2
 gaccgggtcg tgcccctctc tagagataaa gagcattgca tgtctaaggat atcaaaaatt
 60
 accacatatt ttttggcac acttattaa agtgcagttt atctatctct atacacatatt
 120
 ttaaacttca ctttataaat aatatagttt atagtaactaa actaatatca gtgttttaga
 180

taattatata aatgaaccgc tagacatggt ctaaagtaca accgagtatt tgacaacagg
240

actctacagt tttatcttt tagtgtcat gtgttotc tttttttt tttcaaata
300

cttgacctat ataatacttc atccattta ttagtacatc cattagggat tcagggtga
360

tggttctat agactaattt ttttagtacat ctatttatt attttaatt tttaaattaa
420

gaaaactgaa actctatTTT agttactaca aattaaacaa ataccctta aggaattaaa
480

aaaactaagg aaacattttt ctgtttcga gtagattatg acagcctgtt caacgccgtc
540

gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgC gcgtcgggCC aagcgaagca
600

gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gaccctctc gagagttccg ctccaccgtt
660

ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaag tgctggcgg agcggcagac gtgaggcggc
720

ctcctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc cttcccacc gtccttcgc
780

tttcccttcc tcgccccggc taataaaatag acacccctc cacaccctct ttccccaacc
840

tcgtgtttgt tcggagcgca cacacacaca accagatctc ccccaaattcc acccgctggc
900

acctccgctt caaggtacgc cgctcatcct cccccccct ctctaccttc tctagatcgg
960

caatccggtc catggtagg gcccgatagt tctacttctg ttcatgtttg tgtagatcc
1020

tgctgtctag cggtcgtaa cggatgcgac ctgtacatca gacacgttct gattgctaac
1080

ttgccagtgt ttctctttgg cgaatccagg gatggotcta gccgttccgc agacgggttc
1140

gatttcatga tttttttgtt tcgttgcac atagggttg gtttgcctt ttccatttt
1200

tccttatatg ctgtacactc tttgtcggtt catcttgtca tgcttctttt aatcttggtt
1260

gtgatgatgt gctctgggtt ggccgtcggtt ctagatcgga gtagaataact gtttcaagct
1320

acctgggttga tttattaattt ttgtatctgt acgtgtgtgc catacatctt catagttacg
1380

agttaagat gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt
1440

tactgatgca tatacagaga tgctttttt tcgcttgggtt gtgatgatgc ggtctgggtt
1500

ggccgtcggtt ctagatcgga gtagaataact gtttcaaact acctgggttga tttattaattt
1560

ctggatctgt atgtgtgtgc catacatctt gatagttacg agtttaagat gatggatgga
1620

aatatcgatc taggataggt atacatgtcg atgtgggttt tactgatgca tatacatgtat
1680

ggcatatgca gcatctattt atatgctcta accttggatc cctatctattt ataataaaaca
1740

agtatgtttt ataattattt tgaccttgat atacttggat gatggcatat gcagcagcta
1800

tatgtggatt ttttttagctt tgccttcata cgctattttt ttgtttgggg ctgtttcttt
1860

ttgttgacgc tcaccctgtt gtttgggtt acttctgcag
1900

<210> 3
<211> 896
<212> DNA
<213> Zea mays

<400> 3

gtgcagcgtg acccggttgt gcccctctt agagataatg agcattgtat gtctaagtta
60

taaaaaatta ccacatattt ttttgcac acttgttga agtgcagttt atctatctt
120

atacatatat tttaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataaatatca
180

gtgttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatgg ctaaaggaca attgagttt
240

ttgacaacag gactctacag ttttatctt ttagtgcac tgcgttctcc ttttttttg
300

caaatacgctt cacctatata atacttcattt cattttatata gtacatccat ttagggttta
360

gggttaatgg ttttataga ctaattttt tagtacatct attttattct atttttagcct
420

ctaaattaag aaaactaaaa ctctattttt gttttttt ttaatagttt agatataaaa
480

tagaataaaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaaaacta
540

aggaaacatt tttcttgccc cgagtagata atgccagcct gttaaacgccc gtcgacgagt
600

ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcgcg gtcgcgtcgg gccaaagcgaa gcagacggca
660

cggcatctct gtcgctgcct ctggaccctt ctcgagagtt cgcgtccacc gttggacttg
720

ctccgctgtc ggcattccaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag
780

gcggcctcct cctcctctca cggcacccggc agctacgggg gattccttcc ccaccgctcc
840

ttcgctttcc cttcctcgcc cgccgtataata aatagacacc ccctccacac cctctt
896

<211> 831
<212> DNA
<213> Zea luxurians

<400> 4
gaccggctcg tgcccctctc tagagataaa gagcattgca tgtctaaggat atcaaaaatt
60 accacatatt ttttggcac acttatttaa agtgcagttt atctatctct atacacatata
120 ttaaacttca ctttataaat aatatagttt atagtactaa actaatatca gtgttttaga
180 taatttatata aatgaaccgc tagacatggt ctaaagtaca accgagtatt tgacaacagg
240 actctacagt tttatcttt tagtgtcat gtgttcttc tgttttttt tttcaaata
300 cttgacctat ataatacttc atccattta ttagtacatc cattaggat tcagggttga
360 tggttctat agactaattt ttttagtacat ctatttatt attttaatt tttaaattaa
420 gaaaactgaa actctattt agttactaca aattaaacaa ataccctta aggaattaaa
480 aaaactaagg aaacatttt cttgtttcga gtagattatg acagcctgtt caacgccgtc
540 gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc aagcgaagca
600 gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gaccctctc gagagttccg ctccaccgtt
660 ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaag tgcgtggcgg agcggcagac gtgaggcggc
720 ctcctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc cttcccacc gtccttcgc
780 tttcccttcc tcgccccggc taataaaatag acaccccttc cacaccctct t
831

<210> 5
 <211> 82
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 5
 tccccaacct cgtgttggcaca cacacacaac cagatctccc ccaaattccac
 60

ccgtcggtcac ctccgcttca ag
 82

<210> 6
 <211> 83
 <212> DNA
 <213> Zea luxurians

<400> 6
 tccccaacct cgtgtttgtt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca
 60

cccgtcggtcac cctccgcttca aag
 83

<210> 7
 <211> 1015
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 7
 gtacggcgct cgtcctcccc cccccccccc ctctctacct tctcttagatc ggcgttccgg
 60

tccatgcatg gtttagggcccc ggttagttcta cttctgttca tgtttggtt agatccgtgt
 120

ttgtgttaga tccgtgctgc tagcggtcgta acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt
 180

tctgattgct aacttgccag tggggatcc tggggatggct ctagccgttc
 240

cgccagacggg atcgatttca tgatTTTTT tgTTTGTG catAGGGTTT ggTTTGCCT
 300

tttccttat ttcaatatat gccgtgcact tgttgtcg gtcacatttt catgaaaa
 360

tttgtcttgg ttgtgtatgt gtgggtctggg tgggcggtcg ttctagatcg gagtagaaatt
 420

ctgtttcaaa ctacacctggtg gatttattaa ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata
 480

ttcatatgtta cgaattgaag atgatggatg gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt
 540

tgatgcgggt tttactgtatg catatacaga gatgctttt gttcgcttgg ttgtgtatgt
 600

gtgggtgtgg tgggcggtcg ttcattcggtt ctagatcgga gtagaataact gtttcaaact
 660

acctggtgta tttattaatt ttggaactgt atgtgtgtgt catacatctt catagttacg
 720

agtttaagat ggatggaaat atcgatctag gataggata catgttgatg tgggtttac
 780

tgatgcataat acatgtatggc atatgcagca tctattcata tgctctaacc ttgagtagct
 840

atctattata ataaacaagt atgtttata attatttcga tcttgatata cttggatgtat
 900

ggcataatgca gcagctataat gtggattttt ttagccctgc cttcatacgc tatttatttg
 960

cttggtaactg tttcttttgt cgatgctcac cctgttgaaa ggtgttactt ctgca
 1015

<210> 8
 <211> 986
 <212> DNA
 <213> Zea luxurians

<400> 8
 gtacgccgct catcctcccc ccccccctctt accttctcta gatcggcaat ccgggtccatg
 60

gttagggccc gatagttcta cttctgtca tgtttggtt agatccgtgc tgctagcggt
120

cgtacacgga tgcgacacctgt acatcagaca cggtctgatt gctaacttgc cagtgtttct
180

ctttggcgaa tccagggatg gctctagccg ttccgcagac gggttcgatt tcatgatttt
240

ttttgtttcg ttgcacatag ggtttggttt gccctttcc tttatccct tatatgtgt
300

acactctttg tcgggtcatc ttgtcatgct tcttttaatc ttggttgtga tcatgtgctc
360

tggtgtggcg gtcgttctag atcggagtag aatactgttt caagctaccc ggtggattta
420

ttaattttgt atctgtacgt gtgtgccata catcttcata gttacgagtt taagatgtgt
480

gatggaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgc gggtttact gatgcatata
540

cagagatgct ttttttcgc ttgggtgtga tcatgtggc tgggtggcg gtcgttctag
600

atcggagtag aatactgttt caaactaccc ggtggattta ttaattctgg atctgtatgt
660

gtgtgccata catcttgata gttacgagtt taagatgtgt gatggaaata tcgatctagg
720

ataggtatac atgtcgatgt gggtttact gatgcatata catgtggca tatgcagcat
780

ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgtttataaa
840

ttatttgac cttgatatac ttggatgtgt gcatatgcag cagctatatg tggatTTTT
900

tagccttgcc ttcatacgct atttatttgt ttggggctgt ttcttttgt tgacgctcac
960

cctgttgttt ggtgttactt ctgcag
986

```

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico

<400> 9
gctaccgcgg acccggtcgt gcccctctct agagataatg

```

40

```

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico

<400> 10
agtcaaggtag cctgcagaag taacaccaaa caacag

```

36

```

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico

<400> 11
cgtgttggga aagaacttgg a

```

21

```

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>

```

<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico
<400> 12
ccgtggttgg cttggtct

18

<210> 13
<211> 15
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial
<220>

<223> Descricao da Sequencia Artificial: Sonda Sintetica

<220>
<223> 5'FAM

<400> 13
cactccccac tgcct

15

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico

<400> 14
tggcggaacga cgacttgt

18

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico

<400> 15
aaagtttggaa ggctgccgt

19

```
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Sonda Sintetica

<220>
<223> 5'HEX

<400> 16
cgagcagacc gccgtgtact t
```

21

```
<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico

<400> 17
acaagagtgg attgatgatc tagagaggt
```

29

```
<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> Sequencia Artificial

<220>
<223> Descricao da Sequencia Artificial: Iniciador Sintetico

<400> 18
ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt
```

29

```
<210> 19
<211> 29
<212> DNA
```

<213> Sequencia Artificial

<220>

<223> Descricao da Sequencia Artificial: Sonda Sintetica

<220>

<223> 5'FAM

<400> 19

ggtgttgtgg ctggattgc ttacgctgg